

博士論文

論文題目 分単位の経過時間をエンコードする
 ラット海馬の神経発火の同定

氏 名 鹿野 悠

目次

【背景】	p 3
【方法】	p 8
【結果】	p 19
【考察】	p 32
【結論】	p 43
【図表】	p 44
【参考文献】	p 55
【謝辞】	p 61

【背景】

時空間情報をエンコードする海馬：海馬は、「いつ・どこで」という時空間情報に基づく内容を含む「エピソード（様）記憶」（Clayton and Dickinson, *Nature*, 1998)[1]の形成に関わる(Tulving and Markowitsch, *Hippocampus*, 1998)[2]; (Tulving, *Annu Rev Psychol*, 2002)[3]。海馬を損傷した患者は時空間情報の処理や記憶形成に異常をきたすことが報告されている(Scoville and Milner, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1957)[4]。すなわち海馬は空間や時間の情報を神経発火の情報に変換（エンコード）することで処理しているはずである。この神経基盤を解明するため、単一細胞レベルでの海馬の神経発火パターン解析が盛んに行われてきた。場所情報のエンコード（符号化）の例として、場所選択的な神経発火が知られている(O'Keefe and Dostrovsky, *Brain Res*, 1971)[5]; (O'Keefe and Speakman, *Exp Brain Res*, 1987)[6]。これはすなわち、動物がフィールドを探索するときに「ある地点を訪れるたびに発火する」という神経活動を指す。この発見によって、海馬が空間情報をエンコードすることが示された。この発見は2014年ノーベル生理学医学賞の受賞理由ともなった。

一方、エピソード（様）記憶を構成するもう一つの要素である時間情報の処理を担う神経基盤は未解明な点が多い（本研究分野の概観を和文の総説にまとめた(Shikano et al., *Brain Nerve*, 2017)[7]）。そこで本研究では、海馬において時間情報がエンコードされる機構の解明を目的とした。先行研究では、生物が経験する様々な時間長のスケール（数ミリ秒、数秒、数分、数時間など）(Buhusi and Meck, *Nat Rev Neurosci*, 2005)[8]のうち、数秒単位の経過時間に

選択的な神経発火、すなわち「ある時点を迎えるたびに発火する」という神経活動が報告されている(Pastalkova et al., *Science*, 2008)[9]; (MacDonald et al., *Neuron*, 2011)[10]; (Kraus et al., *Neuron*, 2013)[11]; (MacDonald et al., *J Neurosci*, 2013)[12]; (Kraus et al., *Neuron*, 2015)[13]; (Nakazono et al., *Front Syst Neurosci*, 2015)[14]; (Salz et al., *J Neurosci*, 2016)[15]; (Mau et al., *Curr Biol*, 2018)[16]。具体的には、動物が繰り返し決まった時間の長さ(10秒など)だけトレッドミルの上を歩くという行動を繰り返し経験した際に、ある細胞が3秒経過したあたりで選択的にバースト発火する(全トライアルの記録を平均すると、3秒付近に10 Hz程度のピークを持つ応答曲線が得られる)、というような活動である。神経細胞の個々の発火はミリ秒単位という時間の長さで発生するものであるが、このように一過的にバースト発火をすることで数秒の範囲をエンコードすることが可能であるということが、これらの先行研究から示唆される。このような秒単位の経過時間選択的な活動はまた、経験や学習によって生じることが知られている(Gill et al., *Hippocampus*, 2011)[17]。

これらの知見が存在する一方で、秒よりも長い時間長のエンコードについての研究は進んでいない。行動学的な研究によれば動物(ラット)も数分~数時間単位の時間長を記憶することができると報告されている(Roberts et al., *Science*, 2008)[18] (Jacobs et al., *J Neurosci*, 2013)[19]。また、これには海馬が重要であることも示唆された(前出 Jacobs et al. 2013において両側海馬にムシモールを投与して示されている)。しかし、これまでに秒よりも長い時間長において、経過時間と神経発火の相関は調べられてこなかった。従来報告され

ている知見として、海馬や投射関係がある嗅内皮質において、ある空間をエンコードしたり課題遂行時に活動する神経細胞集団が、時間を経るごとに可塑的に変化していくことが報告されている (Manns et al., *Neuron*, 2007)[20]; (Mankin et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012)[21]; (Ziv et al., *Nat Neurosci*, 2013)[22]; (Mankin et al., *Neuron*, 2015)[23]; (Rubin et al., *Elife*, 2015)[24]; (Mau et al., *Curr Biol*, 2018)[16]; (Tsao et al., *Nature*, 2018)[25]。しかしながらこれらの結果はあくまで、場所情報のエンコードが数十分～数時間のスケールで見たときには安定的ではない (時間が経てば経つほどもともとの発火パターンとの相関係数が下がっていく) ということを証明したものである。さらにいえば、上記の研究では必ずしも動物にとって時間情報の処理が課題遂行上求められてはいない行動課題が用いられている。したがって、同じだけの時間が経過したときに同じような神経発火が見られるのか、というような視点からの研究は従来行われてきておらず、分単位などの長い時間経過をエンコードする神経発火が存在するのかについて解明が待たれている。さらには、時間経過をエンコードしていると考えられる複数の神経細胞の発火に基づいて、実際の経過時間を解読 (デコード) することができれば、その存在を裏付けることにつながる。

時間計測の方法：そもそも、時間を測る一般的な方法には「前向き時間計測」と「後ろ向き時間計測」の2種類が存在する。これらは主にヒトを用いて研究が進められている (Block et al., *Acta Psychol (Amst)*, 1980)[26]; (Brown, *Percept Psychophys*, 1985)[27]; (Boltz et al., *Mem Cognit*, 1998)[28]; (Dutke,

Percept Psychophys, 2005)[29]。2つの大きな違いは、被験者が事前に時間計測の必要性を知らされているか否かである。事前に知らされているのが前向き時間計測で、被験者は開始とともに時間を順方向に測り始める。一定時間が過ぎたと感じたらクリックしたりボタンを押したりといった「行動」で知らせる。これならば、動物でも訓練次第で実施することが可能であり、動物にとっての時間経過を行動面から推定して対応付けることが可能である。例えば、動物をレバーのある課題部屋に入れ、手掛かり刺激提示後一定時間が経過してからレバーを押せば報酬がもらえる、というような手続きを学習させればよい。

一方で、後ろ向き時間計測では事前に計測の必要性が知らされない。実験後に経過時間を聞かれ、事後にいわば時間をさかのぼる形で計測する必要がある。その結果は口頭などで自己申告する必要がある、言葉を持たない人間以外の動物で実施するのは困難である。この理由について、動物で実施されている行動課題を例にとって考えてみる。左右2つのレバーがある行動課題部屋を用意する。手掛かり刺激を持続音などにして、2種類の時間長で聞かせたとする。そして手掛かり刺激提示時間長が長かったか短かったかに従って、対応した左右いずれかのレバーを押させる手続きを学習させる。この方法をとれば、言葉を用いることなく後ろ向き時間計測を行わせられるように見えるかもしれない。しかしこの場合では時間長と申告方法を逐一对応付けさせる訓練が必要で、その過程で時間計測の必要性を動物が学習してしまうので、厳密には前向き時間計測をさせていることになる。したがって後ろ向き時間計測を現状動物において行わせることは困難であると判断した。以上の検討を踏まえ、「前向き時間計

測」によって、動物に分単位の行動をとらせる新たな課題を作ることとした。

海馬以外の脳領域での時間のエンコード：海馬で経過時間選択的な発火の存在が最初に発見されたのは 2008 年であるが(Pastalkova et al., *Science*, 2008)[9]、それ以前から行動面の切り口から時間情報処理の研究は行われてきた(Matell and Meck, *Behav Processes*, 1999)[30]; (Matell et al., *Behav Neurosci*, 2003)[31]; (Xu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014)[32]; (Mello et al., *Curr Biol*, 2015)[33]。このような研究グループは主に秒単位の前向き時間計測課題を用いて線条体や大脳新皮質から神経活動を記録をとっている。その結果、これらの脳領域からも経過時間に相関した神経発火や局所場電位の変化が観察された。しかし、海馬を含むここまでで紹介したいずれの脳領域に関しても、分単位の前向き時間計測を行う際の神経発火動態は未解明である。

本研究の概要：上記の背景を踏まえて本研究では、数分単位で経過時間をエンコードする神経細胞の発見を目的とした。これを達成するためには動物に前向き時間計測を行わせて数分単位の行動をとらせる必要があったが、この目的に適う実験系は従来の既製品にはなく、独自の行動実験系『5 分待ち課題』の構築を行った。独自の点というのは、場所情報のエンコードによる影響を減らすために狭い課題部屋である点、待ち時間が数分単位である一方で報酬提示は秒単位であり動物に予測的な行動をとらせる点、そして報酬獲得に失敗した際に報酬を回収する機構を設けた点である。さらに、自由行動下の動物から多数の神経細胞の発火を同時記録する手法を確立した。その結果、単一細胞の発火が数分単位の経過時間をエンコードしていることを明らかにした。

【方法】

■ 動物

実験にはラット(Long-Evans)のオスで 3~6 か月齢のものを用いた。元の体重の 85-90%の値になるように摂食制限を施し、300-400g に維持した。摂食制限した状態で行動課題の訓練を 18~43 日間掛けて行った。明期 12 時間、暗期 12 時間とし、行動課題はすべて暗期におこなった。10 匹に対して 5 分待ち課題の発火記録を実施(うち 5 匹に対して待ち時間スイッチ課題を併せて実施)、2 匹に対して 5 分待ち課題中に薬剤投与を実施、また 3 匹に対して 5 分待ち課題(新奇)を実施した。すべての実験は東京大学ライフサイエンス研究倫理支援室の承認のもとで行われた(承認番号 P29-7)。

■ 5 分待ち課題

動物を行動課題部屋(25cm 四方の正方形)に入れて実施した。部屋の一角にエサ場(幅: 8.9 cm、高さ 1.3 cm、ウェルの直径: 9 mm)を設置した。エサ場は自動エサ提示装置となっている。これは独自設計の PLA 樹脂製のものであり、3D プリンター(UP Plus2, Tiertime, Beijing, China)によって作製した。エサ場には赤外線センサー(フォトリフレクタ LBR-127HLD、Letex Technology Corp., Taichung Hsien, Taiwan)を設置し、動物が報酬を期待してエサ場を確認する行動をモニタリングした。課題は 5 分の待ち時間と 3 秒のエサ提示時間から構成された。待ち時間である 5 分が経過するごとにエサ提示時間を設け、課題用 45 mg ペレット(Precision Pellets F0021-J, Bio-serv, Flemington, NJ)をエサ提示装置のウェルに提示した。エサ提示時間の間はエサ提示装置の脇に

ある LED ライトを点灯させた。これら（エサ提示装置の管理、餌場確認行動の検出、LED の点灯）は全てマイコンボード（Arduino UNO, Arduino S.R.L., Italy）に書き込んだ独自のプログラムによって行った。

エサ提示時間の動物の行動をもとに成績を以下の 2 種類に分類した。

- ・ 成功：エサをウェルから獲得した場合。
- ・ ミス：エサをウェルから獲得しなかった場合。3 秒以内に獲得しないと装置がエサを回収した。以後動物がそのエサを獲得することは出来ない。

動物が最低 3 日連続で 95 %以上の成功率で課題を遂行した場合に、十分な訓練が施された個体であると判断した。動物の部屋内での位置は天井に取り付けた CMOS カメラ(MCM-303NIR-880-LED, Gazo Co., Ltd., Niigata, Japan) によって、320*240 pixels、サンプリングレート 15 Hz で記録した。訓練時の行動課題は 1 日あたり 1 回行い、記録時は 1 日最大で 2 回実施した。

■ 薬剤投与

インジェクション用ガイドカニューレの埋込手術：ラットを 3%イソフルランによって麻酔導入した。脳定位固定装置 (SR-6R-HT, Narishige, Tokyo, Japan) に固定し、以後 1.5-2.0 %イソフルランで維持した。バリカンで頭部の毛を刈ったのち、外科はさみで頭尾方向に 2 cm 程度切開し頭蓋骨を露出した。脳定位固定装置用マイクロマニピュレーター (SMM-200, Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、Bregma, Lambda が水平になるよう固定角度を調節した。次に背側海馬上の座標(AP -5.6 mm, ML ±2.5 mm) にマークをつけた。マークをつけた場所の周辺 6 か所にドリルを用いて直径 0.9 mm の穴をあけ、ステンレス製

ビス (stem width: 1.4 mm, stem length: 3 mm, Stainless steel screw M1.4×3.0, 42617687, MonotaRO, Hyogo, Japan) を埋め込みアンカーとした (頭蓋骨から歯科用セメントが剥離するのを防ぐため)。マークをつけた場所を電動ドリル (SD-102, Narishige, Tokyo, Japan; Minimo ONE SERIES ver.2, C2012, Minitor Co.,Ltd, Tokyo, Japan) で開頭し、直径 2 mm 程度の円形の穴をあけた。25G 注射針 (Terumo Hypodermic Needle, NN-2538R, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を用いて硬膜を剥離し取り除いた。マイクロマニピュレーターにアダプター (Stereotaxic Adaptor, CXSG-X, Amuza Inc., San Diego, CA) を介してガイドカニューレ (Guide Cannula, CXG-X, Amuza Inc., San Diego, CA) を取り付け、カニューレ先端を AP 軸の吻側に 30 度傾けた。ガイドカニューレ先端を脳表から 3.7 mm 刺入させた。脳表部分をゲル (Neuro seal : 塩化カルシウム水溶液とアルギン酸ナトリウム水溶液を混和させたもの) によって保護した。歯科用セメント (Provinice 250 mL, 213620136, Shofu Inc., Kyoto, Japan) を用いて露出した頭蓋骨を覆った。この際アンカービスは完全にセメントに覆われるようにし、ガイドカニューレも操作部を除く全部分が覆われるようにした。作業完了後はセメントが固まるまで 10 分程度待機した。ガイドカニューレの操作部が外部環境から保護されるように、3D プリンターによって設計されたカバーを取り付け、歯科用セメントで固定した。併せて、カニューレカバーより吻側に、行動トラッキング部品を取り付けるジョイントを取り付け、歯科用セメントで固定した。ラットを頭部固定装置から取り外し、飼育ケージに戻し、麻酔から覚めるまで常時観察した。手術後 1 週間は回復期間とし、そ

の後に行動課題の記録を行った。

薬剤投与：動物を休憩箱（20 cm x 20 cm）に入れ、インジェクションカニューレ（Microinjection Cannula, CXMI-X, Amuza Inc., San Diego, CA）を挿入した。シリンジポンプ（Legato 100, KD Scientific, Holliston, MA）を用いて、コントロール（0.9% 生理食塩水）もしくはムシモール（0.1 mg / ml）を投与した。投与速度は 0.2 nl / min で投与量は 1 μ L / site とした。投与終了後 30 分以上インジェクションカニューレを投与個所にとどめた。行動課題はインジェクション開始から 1 時間後に開始した。

■ 電気生理学

動物の頭部に埋め込む電極セットの作製：作成方法は先行研究で詳しく紹介されている(Shikano et al., *J Vis Exp*, 2018)[34]。電極セットのコアボディは 3D プリンターによって作成した。Electrical Interface Board（EIB-36-PTB, Neuralynx, Inc., Bozeman, MT）を取り付け、以後ここにすべての電気シグナルを集約するように電極を接続した。プラチナ・イリジウムワイヤー（17 μ m polyimide-coated platinum-iridium (90/10%) wire, California Fine Wire Co., Grover Beach, CA）を 4 本まとめてねじることで、直径 40 μ m 程度・長さ 6 cm 程度の脳内刺入用の電極を作製し、これを 16 本用意した。コアボディに取り付けた 30G ステンレスチューブのバンドルに電極を装填した。バンドルは 4.3 mm 離して 2 本あり、それぞれに 8 本ずつ電極を装填した。電極セットとは別に、グラウンド兼参照電極を用意した。ステンレスビス（stem width: 1.4 mm, stem length: 3 mm）のねじ頭部分に導線（UEW polyurethane magnet

wire, UEW 0.14mm, Oyaide.com, Tokyo, Japan) をはんだ付けした。

電極セット埋込手術：ラットを 3%イソフルランによって麻酔導入した。脳定位装置に固定し、以後 1.5 - 2.0 %イソフルランで維持した。バリカンで頭部の毛を刈ったのち、外科はさみで頭尾方向に 2 cm 程度切開し頭蓋骨を露出した。固定装置用マイクロマニピュレーター (SMM-200, Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、Bregma, Lambda が水平になるよう固定角度を調節した。次に海馬 (背側 CA1 野) 上の座標 (AP -3.8 mm, ML 2.5 mm) と背側線条体の座標 (AP +0.5 mm, ML 2.5 mm) にマークをつけた (いずれも右半球)。電極セットを近付け、バンドル先端の距離と印間の距離が等しいことを確認した。印をつけた場所の周辺 6 か所に電動ドリル (SD-102, Narishige, Tokyo, Japan; Minimo ONE SERIES ver.2, C2012, Minitor Co.,Ltd, Tokyo, Japan) を用いて直径 0.9 mm の穴をあけ、ステンレス製ビス (stem width: 1.4 mm, stem length: 3 mm) を埋め込みアンカーとした (頭蓋骨から歯科用セメントが剥離するのを防ぐため)。グラウンド兼参照電極を小脳の脳表に埋め込んだ。海馬と線条体のマーク部分を開頭し、直径 3 mm 程度の円形の穴をあけた。25G 注射針を用いて硬膜を剥離し取り除いた。マイクロマニピュレータに電極セットを取り付け、バンドル先端がマークの直上に来るように配置した。ゲル (Neuro seal : 塩化カルシウム水溶液とアルギン酸ナトリウム水溶液を混和させたもの) でバンドル先端と脳表を保護したのち、歯科用セメント (Provinice 250 mL, 213620136, Shofu Inc., Kyoto, Japan) で覆った。セメントが完全に固まるまで 10 分以上待った。マイクロマニピュレータを電極セットから取り外し、電極セット用カバーを取

り付けた。ラットを脳定位固定装置から取り外し、飼育ケージに戻し、麻酔から覚めるまで常時観察した。手術翌日以降には、脳波を観察しながら電極位置の調整を行った。脳波とスパイクを観察しながら、電極が海馬もしくは線条体に到達するまで電極を脳深部（腹側）に向けて下げていった。一日 30 - 250 μm 程度電極位置を移動させた。最終的な電極位置に達するまでに 3 - 4 週間かけた。手術後 1 週間は回復期間とし、2 週目以降から行動課題を実施した。最終的な電極位置に達してからは行動記録と電気生理記録を同時に行った。

電気生理記録： すべての記録は自由行動下で実施した。電極セット上にある Electric interface board にヘッドステージ（Celeplex M, Blackrock microsystems, Salt Lake City, UT）を接続し、記録装置 Cereplex Direct（Celeplex Direct, Blackrock microsystems, Salt Lake City, UT）にデータを送った。サンプリングレートは 30 kHz とした。スパイク検出は記録後に行った。脳波記録からスパイク波形を抽出した。MATLAB プログラムである MClust（by Redish, A.D., <http://redishlab.neuroscience.umn.edu/MClust/MClust.html>）によって特徴量（ピークの大きさ、波形の積分値や PCA 解析結果）を用いて全スパイクをクラスター分類し、それぞれのクラスターがある単一細胞に由来するという仮定の下でデータ解析に利用した。同じ日に記録されたデータに関しては記録データを統合し、一括でクラスター分類した。なお、1 回の 5 分待ち課題で記録された単一細胞を 1 細胞と定義して解析し、全データを集計した際の細胞数は延べ数で表記した。海馬の解析に関しては錐体細胞を主な対象とした。インターニューロンの記録は解析から除外した

(本研究においてはクラスター解析時にみられるスパイクの波形と発火頻度分布に基づいて除外した。厳密な分類のためには遺伝子組み換え個体を用いて光遺伝学的に同定する必要があるが、本研究は時間情報のエンコードの観察を主な目的と定めたものであり、あらかじめ特定の細胞種を対象としたものではないため簡便な分類方法にとどめた)。線條体に関しては中型有棘神経細胞、インターニューロンのいずれも解析対象とした(これらも波形や発火頻度から推定は可能であるが、厳密な分類には遺伝学的な手法を用いる必要がある)。

電極痕跡の確認 (ニッスル染色) : 神経活動記録が完了した動物に対してウレタンを腹腔内注射し麻酔をかけた。その後 4%PFA/PBS を灌流させて固定した。電極を刺入した状態のまま 3 時間以上静置することで、電極跡を脳に残した。電極を取り出してから脳を取り出した。4%PFA/PBS に浸漬して後固定を行い、その後 30% Sucrose 水溶液に 2 日以上浸漬してスクロース置換した。-80 °C に冷却したアセトン中で脳を凍結させ、ミクロトーム (Sliding Microtome, SM2010 R, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて 50 μ m 厚前額断切片を作成した。切片は PLA コートされたスライドガラス (Micro Slide Glass, S7441, Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) に貼り付け、1 日以上風乾させた。プレパラートをニッスル染色し、疎水性封入材 (PARAMOUNT-D, Falma, Tokyo, Japan) で封入した。光学顕微鏡 (All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X710, Keyence Corporation, Osaka, Japan) で 2 倍レンズを用いて切片を可視光で撮影した。撮影された画像データから各電極の記録箇所を特定した。

■ データ解析

すべてのデータ解析は MATLAB を用いて行った。本文中の値の表記は「平均値±標準誤差」で統一した。

行動課題の解析方法：1 トライアルの定義を「1 回のエサ提示時間の開始から、その後の待ち時間の終了まで」と定めた。0 分は「対象トライアルのエサ提示時間終了時点」とし、5 分を「次トライアルのエサ提示時間開始時点」と定めた。解析に用いたトライアルは、着目するトライアルと時トライアルのエサ提示時間でともにエサ獲得に成功した場合に限った（失敗では 0 分もしくは 5 分を定義できないため）。時間ビンを 20 秒とし、エサ場確認行動もしくは発火頻度をビンごとに求めてヒストグラムを作成した。時間ビンには 10 秒のオーバーラップを設けることで値の平滑化を行った。

時間情報量の計算：エサ場確認行動もしくは神経発火が経過時間をエンコードしているかを定量的に評価するために時間情報量という値を用いた。計算式は以下のとおりである(Mau et al., *Curr Biol*, 2018)[16]。

- 時間情報量（エサ場確認行動） =

$$\sum_{i=1} \frac{PR_i}{PR_{total}} \log_2 \frac{PR_i}{PR_{total}} P_i$$

PR_{total} : Peek rate, 全記録時間の平均エサ確認行動割合 (%)

$$\text{※ } PR = \frac{\text{該当する範囲内でエサ場確認行動
をしていたフレーム数}}{\text{該当する範囲内の全フレーム数}} * \text{サンプリングレート}$$

PR_i : i 番目の時間ビンの平均エサ確認行動割合 (%)

P_i : i 番目の時間ビンが全記録時間に占める割合

- 時間情報量 (神経発火) =

$$\sum_{i=1} \frac{FR_i}{FR_{total}} \log_2 \frac{FR_i}{FR_{total}} P_i$$

FR_{total} : Firing rate, 全記録時間の平均発火頻度 (Hz)

$$\text{※ } FR = \frac{\text{該当する範囲内で発火が見られたフレーム数}}{\text{該当する範囲内の全フレーム数}} * \text{サンプリングレート}$$

FR_i : i 番目の時間ビンの平均発火頻度 (Hz)

P_i : i 番目の時間ビンが全記録時間に占める割合

実際のデータから時間情報量を求めるのに併せて、データセットの経過時間をシャッフルしたランダムデータから同じく時間情報量を計算した (1000 回実施)。そしてランダムデータから得た時間情報量の分布に対する実際のデータの Z 値を計算した (時間情報量の Z 値)。Z 値が 2.58 以上 (99%信頼区間に該当) で、かつ平均発火頻度が 0.1 Hz 以上であった場合に、エサ場確認行動もしくは神経発火が有意に時間情報をエンコードしていると評価した。

デコード : 神経発火から経過時間をデコードするために、ベイズ推定法を用いた。はじめにデコードの標的データ (ある 1 トライアル) と参照データ (残りのトライアル) を決定した。はじめにすべてのトライアルのデータについて個々の神経発火頻度のヒストグラム化を行った (時間ビン : 20 秒)。次に、参照データのすべてのトライアルの神経発火と経過時間の対応を調べた。この結果をもとにデコードを行った。標的データのある各時間ビンの神経発火頻度が、それぞれの時間ビンに分類される確率がどれくらいかということについて、すべての時間ビンに関する確率 (事後確率) を計算し、それをまとめたデータを得

た。事後確率 $P(B|A)$ の計算方法は以下のとおりである。

$$P(B|A) = \frac{P(A|B)P(B)}{P(A)}$$

事象 A : 標的データの記録細胞が、ある発火頻度を示す

事象 B : 標的データが、ある時間ビン i に属する

$P(A|B)$: 参照データが属する時間ビン i が明らかになっているうえで、その時に記録細胞がある発火頻度を示す確率

$P(B|A)$: 標的データの記録細胞の発火頻度が明らかになっているうえで、そのデータがある時間ビン i に属する確率

上記の計算をすべての時間ビンに対して行った。記録されたすべてのトライアルを1回ずつ標的データにするように全パターンのデコードを行い、デコード結果の平均値を求めた。さらに各細胞のトライアル番号をランダムに入れ替えて合計 10 通りのデータセットでデコードを行った。データの前処理を自作のプログラムによって行い、`fitcnb` を用いてベイズ推定を行った。推定の正確性を定量するために、推定誤差（予測された時間と実際の時間の差）を求めた。時間情報をランダム化したシャッフルデータのベイズ推定によって求められた推定誤差と比較し、two-sample t -test によって検定を行った。

Best scaling factor の計算 : 5 分待ち課題で得られた発火頻度変化と、同神経細胞の 8 分待ち課題で得られた発火頻度変化の関係性を調べるための解析である。時間ビン 30 秒（オーバーラップ 20 秒）でヒストグラムを計算し、発火頻度曲線を得た。片方（ここでは 8 分のもの）のデータの発火頻度曲線の経過時間に係数を掛けて時間軸方向に伸縮させた。定数を 0.6~1.5 の間で変化させた

ときに、2 つの条件で得られた発火頻度変化の曲線の相関係数が最も高くなる係数を求めた。係数をかける変換処理は自作のプログラムで行い、その後 `corrcoef` によって相関係数を求めた。

【結果】

■ 行動試験の構築と行動解析

動物に分単位の行動をとらせるような既製品が存在しなかったため、本研究の目的に適う行動課題を独自に構築することを目指し、初めにその設計を行った。そして「前向き時間計測」を動物に行わせることを目的とした行動課題を構築した。これを「5分待ち課題」と呼ぶこととする。Figure 1で課題部屋 (Fig. 1A) の図とタイムスケジュール (Fig. 1B) を示す。課題中は5分間の待ち時間と、3秒間のエサ提示時間が交互に繰り返された。5分の待ち時間が過ぎると、課題部屋の一角に設けたエサ場から報酬であるペレットが3秒間のみ提示された。訓練を繰り返すことで、ラットには3秒間のうちにエサ場からエサを獲得することを学ばせた。エサ提示時間の間に獲得されない場合は、装置がエサを回収した。すなわち、5分間の時間経過を頼りにしながらより適応的な行動をとることで、より多くの報酬が獲得できる課題設計とした。訓練を繰り返したラットの行動を観察したところ、5分の待ち時間中にエサ場に顔を近付ける行動、すなわちエサ場確認行動 (Fig. 1A 写真) が観察された。そこでエサ場に赤外線センサーを取り付け、この行動をモニタリングした。

エサ場確認行動の解析結果は Figure 2 にまとめられている。十分に訓練された個体から記録を行った (Fig. 2A,B)。Fig. 2A では、待ち時間の開始点 (ただし、直前のエサ提示時間でエサの獲得に成功した場合のみを採用) を0分と定め、その終わりを5分と定めて、その記録中のすべてのトライアルの結果をまとめた。オレンジの点でエサ場確認行動をしていたタイミングを示した (ラス

タープロット)。同じくヒストグラムでは、単位時間当たり何パーセントエサ場確認行動をしていたかを示した（平均±標準誤差）。5分が近づくにつれ徐々にエサ場確認行動が増加する傾向が観察された。そこで、この行動を個体にとっての時間経過の指標とすることにした。そのために、エサ場確認行動がどの程度経過時間に相関しているのかを定量的に評価する必要があった。本研究においては時間情報量という値を利用した（計算式は【方法】データ解析を参照）。時間情報量が大きければ大きいほど、エサ場確認行動が時間的に偏って分布することを意味する。有意性の評価には時間情報量の Z 値を利用した。2.58 以上であれば有意に時間経過に依存していると評価した（図に示したデータの計算結果は 9.16）。記録された全個体全セッションの結果を Fig. 2B にまとめた（時間情報量 Z 値 = 6.42 ± 0.91, 37 sessions from 10 rats）。

次に、5分待ち課題で観察された行動面での経過時間選択性に海馬が重要であるかを検証した（Fig. 2C,D）。両側の海馬にインジェクションカニューレを刺し入れて、GABA_A受容体作動薬であるムシモールを投与した（0.1 mg/ml, 1 μL/side）。同一個体に対してコントロールの 0.9% 生理食塩水、もしくはムシモールを投与した結果をヒストグラムにして示し、比較した。時間情報量の Z 値は各グラフの右上に表示されている。コントロールでは5分の待ち時間の前半（0~2.5分付近を指す）はエサ場確認行動が少なく、後半（2.5-5分付近を指す）では増加した。時間情報量からも有意に時間経過に相関した行動をとっていることが示唆された。一方でムシモール投与下では5分にかけてのエサ場確認行動の増加は見られず、時間情報量もランダムレベルにとどまった。海馬へ

のムシモール投与によって、エサ場確認行動の時間情報量がランダムレベルへと低下し、さらに両条件の値には有意差が認められた（時間情報量 Z 値 = 3.92 \pm 0.72 (コントロール), 0.48 \pm 0.44 (ムシモール), $**p < 0.01$, $t_3 = 8.25$, paired t -test, $n = 4$ sessions each)。また課題成績である報酬獲得回数自体には有意な差は認められなかった（20 トライアルのうちミスをしたトライアル回数 = 0.75 \pm 0.25 (コントロール), 1.75 \pm 0.48 (ムシモール), $p = 0.09$, $t_3 = 2.45$, paired t -test, $n = 4$ sessions from 2 rats)。すなわち、ムシモール投与群では課題遂行そのものには顕著な影響が見られなかったものの、待ち時間中のエサ場確認行動の経過時間への相関の程度に顕著な影響が見られた。

以上の結果をまとめると、前向き時間計測を利用した新たな行動課題（5 分待ち課題）においてラットは分単位の時間経過に相関した行動を示した。また海馬の活動を抑制することで時間経過に相関した行動が阻害された。

■ 時間経過をエンコードする神経発火の同定

次に、5 分待ち課題に取り組むラットの海馬神経発火を記録・解析することで、時間経過に相関した神経活動を同定した。ここでは海馬に加え、線条体からも神経発火を同時記録した。線条体は前述の通り秒単位の時間経過に相関した神経活動を示すことが知られており、先行研究も多い。そこで、線条体の分単位の活動解析についても目的として記録を行った。その手法として、自由に動き回るラットから脳波を多チャンネルで記録する手法を用いた (Fig. 3)。すでにこの手法を用いて 3 本の論文を執筆している (Shikano et al., *Neurosci Res*, 2018)[35]; (Shikano et al., *Eur J Neurosci*, 2018)[36]; (Shikano et al., *J Vis*

Exp, 2018)[34]。しかしながら、海馬と線条体は 4 ミリ以上離れており、現在までに設計した電極セットでは同時記録を行うことができなかった。そこで新たに電極セットのコアボディ部分を設計し直し、3D プリンターで作製した。具体的には電極を装填するバンドル部分を 2 つに分離し、それぞれ海馬もしくは線条体を標的として埋め込んだ (Fig. 3A 中央)。記録装置の埋め込み後、神経発火を記録するまでには 3 週間以上の期間を要した。その理由として、電極先端を脳表から 2500 μm 程度深部にある海馬 CA1 錐体細胞層 100 μm に合わせて静置する必要があることがあげられる。記録中にわずかにでも電極先端がずれると、神経発火のシグナル強度が変化し、のちの解析において同じクラスターとして分類されなくなる (テトロードを用いた多数の神経細胞の発火記録の原理は Fig. 3 D を参照)。脳は柔軟性があるため、電極を降ろしてから位置が安定するまでには 1 日程度かかる。そのため何週間もかけて毎日 30-250 μm 程度ずつ電極を動かし、電極位置を脳波から把握しながら調整することが必要であった。一つの電極からは最も良い条件で 10 細胞前後の神経発火のクラスターを抽出することができた。単一個体からは最大で 30 細胞程度の海馬神経細胞を記録した。一方で錐体細胞層から少しでもずれると神経発火を記録することはできず、解析には至らなかった。線条体は一方で細胞体が散在しており、一つの電極から記録されるクラスター数が 4 つ程度と限られていた。そのため日々電極を動かし、できる限り複数の神経細胞が記録されるように位置を調節した。ラット 1 匹あたりから、海馬から 3-46 細胞、線条体から 2-16 細胞に由来する神経発火を同時記録した。全 10 個体から記録された神経発火を解析に

用いた。

記録された神経細胞のうち、経過時間に相関した神経発火が見られた例を Figure 4 に示した。これらの神経細胞は十分に訓練された個体から記録されたものである。データの表示方法は Figure 2 のエサ場確認行動と基本的に同様である。ラスタプロット (Fig. 4A 左) では一つの点はその神経細胞の一回の発火が生じたタイミングを示す。この神経細胞は、多くの試行において 5 分の待ち時間の後半で発火が多く見られた。発火をより定量的に表示するために、以後は異なる (Fig. 4A 右) 表示形式を採用することにした。この表示形式においては、20 秒ごとに時間ビンを定め、その中での発火頻度を色と対応付けて疑似カラー表示した。色が赤いほどその時間帯の発火数が多いことを意味する。この表示形式を採用して、Figure 4B では記録細胞のうちとくに時間経過に相関した活動がみられた 4 細胞の結果を示した。それぞれの神経細胞の疑似カラープロットの下にヒストグラムは、その時間ビンにおける平均発火頻度を示す (平均 ± 標準誤差)。海馬の細胞例①と線条体の細胞例①は待ち時間の間に徐々に発火頻度が増加した。一方で海馬の細胞例②は 1 分周辺で発火頻度のピークをとり、以降の待ち時間では徐々に減少していった。線条体の細胞例②は待ち時間の前半で発火頻度が高かった。これらの発火パターンが経過時間をエンコードしているかを定量的に評価するために、時間情報量を計算した (計算方法は【方法】データ解析を参照)。いずれの神経細胞の時間情報量もランダムレベルより有意に高かった (時間情報量 Z 値 = 17.83 (海馬の細胞例①)、14.22 (海馬の細胞例②)、14.21 (線条体の細胞例①)、3.96 (線条体の細胞例②))。以上の結果か

ら、神経発火によって時間経過がエンコードされていることが示された。

Figure 5A では記録したすべての神経細胞の平均発火頻度（横軸）と時間情報量の Z 値（縦軸）をプロットした（海馬：277 細胞、線条体 124 細胞）。1 つの点が 1 つの記録細胞に対応している。中でもマゼンタで示されている細胞（海馬：48 細胞、線条体 20 細胞）は、有意な時間情報量を持ち、かつ発火頻度が 0.1 Hz 以上のものである。海馬でおよそ 17%、線条体ではおよそ 16%の細胞が経過時間をエンコードしていた。Figure 5B では経過時間をエンコードする細胞の発火頻度変化を一覧で示した。各細胞の平均発火頻度を標準化し、横一列の疑似カラー表示でまとめた。そして、最大発火頻度を取ったタイミングが待ち時間の中で早い細胞から順に並べた。各細胞が最大発火頻度をとったタイミングは細胞ごとにさまざま（Fig. 5C も併せて参照）で、5 分間にわたって広く分布していた。つまり、多数の神経細胞が、待ち時間中の特有のタイミングでそれぞれ発火することでネットワーク全体として 5 分が表現されていた。以後、これを多数の神経細胞からなる発火列と呼ぶ。

次に、経過時間をデコード（エンコードの対義後に当たる用語）、すなわち発火列の情報を用いて実際の経過時間を解読することを試みた（Fig. 6）。デコードを行う目的として、5 分の待ち時間において時間経過に 관련된神経発火が、いずれのトライアルにおいても再現性良く発生していることを検証することがあげられる。例えば、もし毎回の試行で発火列が生じて時間がエンコードされているのであれば、神経活動パターンと経過時間の間には対応関係を見出すことができるはずである。その場合、たとえあるタイミングの時間情報が与えら

れなかったとしても、その際の神経発火のパターンさえわかれば、経過時間は推定できるはずである。これはまた、複数の細胞が集団として 5 分にわたる時間のエンコードを行っていることを支持する証拠にもなりうる。この検証をベイズ推定によって実施した。初めに、記録されたトライアルをデコード対象のトライアル（対象データ）とそれ以外のトライアル（参照データ）に分けた。参照データからそれぞれの神経細胞の発火頻度と時間との間の対応関係を調べた。次に対象データにおける、ある時間ビンの発火パターンに着目した。その発火パターンが生じたという条件のもとで、0~5 分の中どのタイミングのものであるのかという確率をそれぞれ算出した。Figure 6A にデコード結果を示した（左：海馬、右：線条体）。横軸で実際の時間、縦軸で推定された時間を示し、色で推定確率を示す。それぞれの軸の 0 分と 0 分、5 分と 5 分にかけて対角線上に確率の高い部分が見られた。すなわちデコード結果が実際の時間に対応していることが示された。併せて参照データの経過時間の情報をシャッフルしたデータについてもデコードを実施した。そして、推定時間の誤差を比較したところ（Fig. 6B）、実際の記録を用いた推定はシャッフルデータの結果よりも有意に推定誤差が小さいことが示された（海馬、Real: 0.45 ± 0.03 分、Shuffle: 1.6 ± 0.05 分、 $\# p = 2.4 \times 10^{-13}$, $t_{18} = 18.98$, two-sample t -test, $n = 10$ sets）（線条体、Real: 0.77 ± 0.05 , Shuffle: 1.6 ± 0.08 、 $\dagger p = 8.2 \times 10^{-8}$, $t_{18} = 8.63$, two-sample t -test, $n = 10$ sets）。

以上をまとめると、海馬と線条体の一部の神経細胞が、分単位の経過時間をエンコードした発火をすることが示された。また神経細胞ごとに活動タイミン

グを持っていた。これをネットワークレベルでみると、5分にわたる発火列が見られた。このような、分単位における自発的な神経発火パターンの変遷は世界初の報告となる。

■ 経験が時間経過のエンコードに与える影響の解析

ここまでの実験においては、5分課題を十分に訓練されたラット、すなわち「5分間隔で報酬が提示される」ことを経験的に学んだラットから記録した神経発火を解析してきた。しかしこれだけでは、どのようにして時間がエンコードされるようになるのか、具体的には経験や学習が経過時間のエンコードに必要であるのかについて検証することができてはいない。そこで以下の2種類の行動課題を実施した。

5分課題（新奇）の実施

上記の点について検証するために、まず5分課題を訓練されていないラットから記録を行う必要があった。そこで、記録を行う前にラットを行動課題部屋に慣れさせ、エサ提示装置から報酬を獲得することができるということだけを訓練させたラットを用意した（Fig. 7A）。この訓練では、エサを提示する時間間隔を4~20秒のランダムなインターバルとした。訓練が完了したのちに記録を行い、その際に初めてエサ提示間隔を5分に伸ばした（これを「5分待ち課題（新奇）」とよぶ）（Fig. 7A）。もし経験や学習によって経過時間がエンコードされていくのであれば、5分待ち課題（新奇）の最初期においては5分をエンコードしている神経発火はほとんどみられないはずである。一方経験や学習

によらない可能性も考えられる。たとえば報酬に応答した活動が分単位で持続したり、ペレットが代謝されるのに分単位の時間を要したりする場合である。このような現象の時間経過が単に神経発火に反映されているだけなのであれば、経験の有無にかかわらず最初期であっても分単位の時間のエンコードは存在し、その割合と時間情報量の Z 値は課題を通じて同程度のはずである。

まずエサ場確認行動の解析を行った。Figure 7B に示すのが本条件下における代表的なエサ場確認行動の結果であり、データの表示方法は Figure 2A と同様である。5 分の待ち時間中の時間経過に関わらず、エサ場確認行動が頻繁にみられた。十分な訓練を受けた個体で見られたような 5 分にかけて徐々にエサ場確認行動割合が増える傾向は見られなかった。時間情報量に関しても Z 値がランダムレベルにとどまった（時間情報量 Z 値=1.9）。したがって、5 分待ち課題（新奇）において行動レベルでの時間経過との相関は見られなかった。

次に神経活動を解析した（Fig. 8）。Figure 8A では海馬と線条体の細胞の神経発火の例を 1 細胞ずつ示した。まず 5 分待ち課題（新奇）の中でも「課題全体における前半」のトライアルだけに着目した（ここでは 7 トライアル目までを「課題全体における前半」と表現している。個々のトライアルの「5 分間における前半」（0~2.5 分）とは異なるので注意されたい。）。すると、経過時間をエンコードしているような特徴的な発火パターンは見られなかった。しかしながら、続きとなる「課題全体における後半」のトライアル（ここでは 8 トライアルよりも後のトライアルを指す）を見てみると、5 分に向けて徐々に発火頻度が増加していく傾向が見られた。そこでそれぞれの部分に対する時間情報量を計算した。すると前半では時間情報量の Z 値はランダムレベルだった（時間情報量 Z 値=-1.01（海馬の例）, 1.25（線条体の例））。しかし、後半では有意に時

間情報をエンコードしていた（時間情報量 Z 値=4.39 (海馬の例), 9.31 (線条体の例)）。つまり 5 分待ち課題（新奇）のはじめは 5 分の時間経過に対応した神経発火は見られないものの、何回かトライアルを経験することでエンコードされてくることが示唆された。

そこで各細胞の時間情報量の推移を観察した(Fig. 8B)。連続するトライアルを 6 つずつまとめ、1 トライアルずつずらしていくことで順に時間情報量を計算した。はじめのデータ（トライアル番号 1-6）を特に 5 分待ち課題（新奇）の課題全体における最初期のトライアルセットとして着目し、課題全体における終盤のトライアルセットと比較した。プロットされているのは少なくとも 1 つのトライアルセットで有意な時間情報量を示した細胞である。全体的な傾向を見ると、トライアルを重ねていくにしたがって時間情報量が増えた細胞が多く見られた（黒と赤のトレース）。課題全体における最初期に有意な時間情報量を持つ 2 細胞に関しては（青のトレース）、1 細胞は Z 値が低く一過的なものであり、もう 1 細胞は安定的に発火していたものとは言えず発火頻度が低かったことで最初期以降では時間情報量が計算できなかった（0.1 Hz 未満）。

次に海馬と線条体の細胞に分けて、詳細に解析を行った（Fig. 8C）。ここでは記録されたすべての細胞の結果を示した（海馬：36 細胞、線条体：25 細胞）。図の示し方は Figure 5A と同様である。Figure 8C 上段は 5 分待ち課題（新奇）の最初期の 6 トライアルのデータをまとめた結果である。経過時間をエンコードする細胞がほとんど見られないばかりか、あっても発火頻度と Z スコアの小さいものであった。Figure 8C 下段は課題終盤の 6 トライアルのデータをまとめた結果である。経過時間をエンコードする細胞が見られた。経過時間をエンコードする細胞の割合は、海馬では課題全体における最初期から終盤にかけて 6%→8%となり、線条体では 0%→24%と変化した。以上の結果から、5 分課題（新奇）に取り組む動物においても、すでに経過時間のエンコードは生じる

ことが明らかとなった（特に課題全体における終盤）。一方で課題全体における最初期には安定的に時間をエンコードしている細胞がほとんど見られなかった一方で、課題の進行に伴って徐々に有意な時間情報量を持つ細胞数が増加していくことから、学習や経験が重要であることも示唆された。

待ち時間スイッチ課題の実施

では、5分課題を経験することで形成された時間経過に 관련된神経発火は、単に流れていく時間をエンコードしているのだろうか、それとも5分という時間をターゲットとしその前後でエンコードに差があるのだろうか。それを検証するために、新たな条件「待ち時間スイッチ課題」を試みた（Fig. 9）。本条件では5分課題を十分訓練した個体を使用した。5分待ち課題を10トライアル行った後、残りのトライアルは8分間の待ち時間で行った（Fig. 9A）。動物にとっては、途中から突然待ち時間が3分延長されたということになる。もし待ち時間が8分になった後も、5分の前後であるかにかかわらず発火頻度が時間経過とともに増え続けたり、減り続けたりするのであれば、これらの神経発火は5分をエンコードしているというよりも持続的な時間の経過をエンコードする発火であるといえる。一方で5分を境界として発火パターンが何らかの変化を示すのであれば、時間長そのものが0分を始まりとし5分を終わりとした記憶としてエンコードされているといえることができる。Figure 9Bでは特徴的な活動パターン変化がみられた2つの細胞例を示した。結果はそれぞれ変更前の5分と、変更後の8分に分けて解析した。Figure 9B左の細胞は、もともと5分に向けて発火頻度が徐々に増加する活動をしていた。8分に変更後もそれが維持され、5分にかけて増加した。しかし5分以降は一転して発火頻度が減

少し、結果として 5 分をピークとした活動を示した（時間情報量 Z 値 = 2.58 (5 分), 12.34 (8 分))。対して、Figure 9B 右の細胞は、もともと一度発火頻度が下がってから、5 分に向けて発火頻度が再び増加する特徴があった。8 分に変更後は、5 分付近で発火頻度が増加してくることはなくなり、代わりに新たな標的となった 8 分に向けて発火頻度が増加した（時間情報量 Z 値 = 4.42 (5 分), 4.31 (8 分))。すなわち、5 分を境に変化が見られたり、8 分に対して発火パターンを変化させたりと、いずれの細胞についても単に持続的な発火頻度変化を示すような活動とは考えにくいものである。Figure 9C ではこれら 2 細胞の 5 分と 8 分の条件での発火パターンの相関係数を調べた。そして 8 分の条件で得られた発火頻度曲線を時間軸方向に相似変換した際の相関係数の推移を調べた (Fig. 9C 上段)。そして最も高い相関係数をもたらした変換倍率を最適変換倍率と定めた。Figure 9B 左の細胞の最適変換倍率は 0.88 倍 (相関係数 0.77) であった。Figure 9B 右の細胞の最適変換倍率は 0.66 倍 (相関係数 0.76) であった (Fig. 9C 右下の点線を参照)。Figure 9B 左の細胞は、5 分までの発火頻度上昇は待ち時間スイッチ前後に関わらず類似していることが示された。しかし 8 分待ちの条件では 5 分周辺を境として自発的に発火頻度が減少していったことが特徴的である。また、そもそも待ち時間の変換倍率は $5/8 = 0.625$ 倍である。このことから、Figure 9B 右の細胞は、8 分の条件において 5 分の条件下での発火と類似し、且つ時間軸方向に相似変換したような活動を行った可能性が考えられる。

本項では 2 つの条件、すなわち 5 分待ち課題（新奇）と待ち時間スイッチ課

題の結果を示した。5分待ち課題（新奇）の課題全体における最初期の神経発火は経過時間を顕著にエンコードしておらず、その後の数トライアルの経験を経て徐々に経過時間がエンコードされていく神経細胞が存在した。待ち時間スイッチ課題での変更前後の発火パターン比較では、5分のエンコードを続ける細胞と、8分をエンコードするように柔軟に発火パターンが変化する細胞が観察された。これらの結果から、経験によって経過時間がエンコードされていくメカニズムの存在が示唆された。

【考察】

エサ場確認行動の経過時間選択性について：本研究においては5分に近づくとつれてエサ場確認行動をとる割合が徐々に増加した。この結果は秒単位の時間情報処理に関する先行研究（「前向き時間知覚」による時間計測を動物に行わせている実験）とも整合性が取れている。秒単位の時間情報処理の研究では、広くレバープレス課題が用いられている (Matell et al., *Behav Neurosci*, 2003)[31]; (Yin and Meck, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014)[37]; (Delamater and Nicolas, *Int J Comp Psychol*, 2015)[38]; (Emmons et al., *Front Psychol*, 2016)[39]; (Emmons et al., *J Neurosci*, 2017)[40]; (Kim and Narayanan, *Cereb Cortex*, 2018)[41]。レバープレス課題は、一定の標的時間（例えば12秒など）が経過してから初めてレバープレスがなされた場合に報酬が動物に与えられるという課題である。標的時間が過ぎたことは動物に知らされないため、動物自身の判断でレバープレスを行う必要がある。プレス回数に制限はなく、標的時間経過前にプレスしても罰則は設けられていない。そのため訓練された個体は標的時間にかけて徐々にレバープレス頻度が高くなっていき、標的時間付近で最も高くなるという行動を示す。この報告は本研究で得られた行動結果と整合性が高く、どちらの課題でも動物は報酬が得られる確率が高い時間帯で行動を頻繁に引き起こしているという点で共通している。

一方で、5分待ち課題はレバープレス課題よりも優れている点がある。レバープレスは課題に特有な手続きとなる行動であるが、5分待ち課題のエサ場確認行動は報酬に直結する行動そのものを評価できている点である。レバープレ

ス課題では、通常は報酬提示箇所とレバーのある箇所とは異なっている。さらに最終的にはレバーを引かない限り報酬が与えられることがないため、その運動が強化されて積極的にレバープレスという運動を引き起こすようにトレーニングされてしまう。このような運動をとらせることで神経発火にも運動の要素が多く入ってしまうため、神経発火の解析には適さない。対して、本課題ではエサ場確認行動そのものを積極的に行うように訓練してはいない。エサ場を確認しなくても5分経てば自動的にエサは提示されるからである。つまりエサを獲得するためには、エサ提示時間が始まったことをLEDの手掛かりによって知ってからエサ場ののぞき込めばよい。それが本来最も効率の良い行動とならずである。しかしながら、動物は訓練で強化されているわけではないはずのエサ場確認行動を自発的に行った。これは内在的な価値判断（時間が近づいてきたら確認しておいたほうが適応的）を反映していると考えられる上に、時間に対する動物の判断の指標として実験者が評価することもできる。したがって、経過時間依存性を検証するのに適していて直接的な証明にもなっていると考えられる。またこの行動が、訓練で強化された時間長について最も適応するものであれば、5分以外の時間で再訓練した場合には別の時間を標的とするよう行動が変化するはずであると考えている。これはすでに秒単位の課題においては証明されている(Xu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014)[32]; (Mello et al., *Curr Biol*, 2015)[33]。

一方で、5分待ち課題においては時間経過に相関して変化していく要素の存在も否定できない。例えば報酬獲得に伴う血糖値の変化があげられる。本研究

では血糖値変化を解析してはいないため、5分のスパンにおいて実際どの程度トライアルごとに安定した変化が持続的に生じるのかについて検証はできていない。しかし、もし血糖値や代謝産物濃度などの変化が持続的に生じるのならば、それらは神経細胞が時間経過をエンコードする際の手掛かりになるのかもしれない。これらの影響を完全に排除するためには報酬に頼らない課題を行う必要がある。例えば手掛かり刺激から一定時間後に電気ショックが与えられるという課題において、電気ショック到達の直前にレバーを押せば回避できるというような課題が考えられる。このような課題の訓練には報酬を用いる課題よりも長い期間を要するが、訓練が成功すれば報酬獲得に伴う時間経過成分を除外して考察することができるはずである。この課題においても時間情報のエンコードが報酬を用いる課題と同様に行われていた場合、そのほかに呼吸や心拍リズムといった内在的な要素の影響も考えられるだろう。

レバープレス課題のような課題とは切り口の異なる行動実験系として、時間長弁別課題がある(Kim et al., *Front Behav Neurosci*, 2009)[42]; (Kim et al., *J Neurosci*, 2013)[43]; (Gouvea et al., *Elife*, 2015)[44]; (Soares et al., *Science*, 2016)[45]。背景でもふれたように、この課題においては時間長判断を時間長提示の後に行わせる（これを「後ろ向き時間計測」だと主張するグループもいるが、動物に時間計測をさせる訓練をしない限りこの課題は実現しないので、あくまで前向き時間計測に属するものであると私は考えている）。時間長弁別課題では、時間計測中の行動に加えて、時間長判断時の行動もデータとして得られるので、実験系としてはより優れているといえる。しかし大きな難点がある。

それは訓練が困難でかつより長い期間が必要であるという点である。たとえ秒単位の課題であっても学習させるには最低1か月程度の期間が必要である。分単位の時間長を扱えるようにするためには、まず一度は秒単位の訓練を行って、それから時間長を順に伸ばしていくしかなく、訓練には数か月単位の時間を要する。したがって、今回の研究に際しては5分の時間長を対象とするには不向きであると判断した。そのみならず、時間長弁別課題では実験条件を6条件程度用意し、個々の条件のトライアル数もより多く必要となる（条件によっては正答率が50%程度のものがあるため）。実際、本研究においてもはじめの1年間は時間長弁別課題の訓練を試みていたが、最終的に学習を成立させることができなかった。これらの理由からも、本研究においては5分待ち課題を選択したのは適切であると判断される。

5分待ち課題における海馬の重要性について：本研究では海馬をムシモールによって抑制するとエサ場確認行動の時間経過選択性が失われた。薬剤投与実験は光遺伝学などと比較すると時間分解能が低いため、本実験だけでは海馬が時間情報の処理に重要であるかは、本来であれば判断するのが難しい。また、そもそも光遺伝学を用いたとしても、海馬そのものが時間情報を作り出しているのか、それとも情報の中継点に過ぎないのか、という疑問に対して答えを出すことはできない。これは本研究に限らず現在の神経科学の限界点でもある、すなわち本研究で主張される「海馬の重要性」とは、海馬が関わる一連の情報伝達経路が時間情報の処理に重要であるという意味を持つ。したがってこの情報伝達経路を担う可能性のある他の脳領域（新皮質など）の重要性を否定するも

のではない。次にその他の点（5分待ち課題の手続きそのものを忘れてしまっているのではないのか）について考えていきたい。先行研究を踏まえると本結果の意義が見えてくる。まず、時間的に隔てられた事象間を結びつけるときに海馬が重要であるということが知られており、恐怖条件付け学習などを用いて研究が進められている(Quinn et al., *Hippocampus*, 2002)[46]; (McEchron et al., *J Neurosci*, 2003)[47]。5分待ち課題に関しても、エサ提示時間は、1つには「エサを獲得できる時間である」という意味があるのに加えて、もう1つとして「5分後にエサが再び提示される」ということも示す手掛かりになっている。したがって5分も時間的に隔てられたエサ提示時間を結び付けて経験しているからこそ、動物は本課題を遂行できるのである。これには海馬が重要な役目を担うことが考えられるため、本研究の結果と整合が取れている。加えて、海馬を除去した個体であっても、秒単位の実験においては行動に限定的な影響しか見られていないことが知られている(Meck et al., *J Neurosci*, 1987)[48]; (Olton et al., *Brain Res*, 1987)[49]; (Yin and Meck, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014)[37]。これは例えば、標的時間付近で行動割合が高くなる、という傾向は海馬の有無によらず見られるということを示唆する。一方で分単位の条件である本研究においては、経過時間に相関した行動が表出されなくなった。これらの結果を踏まえれば、例えばトライアルの開始がわからなくなったなど、時間計測以外の側面で課題の遂行が困難になっているという結果であるとは考えにくい。すなわち先行研究との違いは時間長が秒単位か分単位かということが大きい。加えて、ムシモール投与下であっても課題のルール自体は理

解しているはずである。なぜならエサ場確認行動自体は生じており、報酬提示時間には報酬獲得をしたからである。これはすなわち、5分待ち課題の部屋においてはそのエサ場からエサが提示されるという空間情報自体は保持されているということを強く示唆する。このような結果を踏まえ、海馬、もしくは海馬が関与する一連の脳領域間での情報伝達は、分単位においては時間経過の計測に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。ムシモールは GABA_A 受容体アンタゴニストであるため、GABA を介した海馬のシグナル経路が時間情報のエンコードに重要であると考察することもできる。しかしながら本研究においてはあくまで海馬の神経活動の重要性を主張するにとどめる。なぜならムシモールは先行研究においても、その脳領域の神経細胞集団の活動を全体として抑制するために用いられてきている背景があるからである。この時抑制される神経細胞集団は、グルタミン酸、ドパミン、セロトニンなども受容することは否定できない。そのため、伝達経路の詳細な解析のためにはそれら各受容体のアンタゴニストを投与したりノックアウト個体を作製したりする必要がある。これらの理由から、本研究においてはムシモール投与によって海馬、そして海馬が関わる情報伝達経路の重要性が支持されたと考えられる。

時間経過に 관련된 行動に対する 経験・学習の影響：十分な訓練を施した個体では、エサ場確認行動が時間経過に伴って増加した。この行動に関しては複数のメカニズムが考えられた。例えば動物が5分の時間長自体を学んでいなくても、時間経過に伴って空腹感が増していくことで待つことが出来なくなり、結果としてエサ場確認行動が増えるといった可能性である。しかし、本研究の結

果は、この行動があくまで経験に伴って生じてくるものであることを示唆している。5分待ち課題（新奇）においては、0分から5分にかけて時間経過に相関した行動は見られず、どの時間帯においてもエサ場確認行動割合は有意な差が見られなかった。ペレットの大きさはどの条件においても同じであるので、空腹感の変化度合いは事前の訓練の有無に関わらず同様であるはずである。したがって訓練によって5分間隔でエサが提示されるということを経験することを通して、時間経過に相関した行動が現れてくると考えられる。5分に近づくとつれてエサが提示される確率は高まっていくため、それを反映した行動である可能性が考えられるし、他にもエサがなかなか出てこないことによる情動変化（焦りなど）が反映されている可能性もある。本実験ではこれらの違いを区別することは出来ないし、この区別を目的とする行動課題ではない。また、0分直後の行動抑制が原因か、5分付近の行動促進が原因かといったことも本実験から明らかには出来ない。しかしいずれのメカニズムも、「5分が近づけばエサが提示されるという予測」を動物自身が持っているからこそ生じる行動や情動であることに変わりはない。したがって、5分待ち課題の訓練の結果として時間長を記憶したからこそ生じた時間経過に相関する現象・行動であると考えている。

経過時間をエンコードする発火の発生メカニズムについての考察：このような神経発火をもたらすメカニズムについては本研究の目的（神経細胞によるエンコードの有無を検証する）をさらに超えた未解明な点であるが、従来の知見を踏まえながら考察していきたい。まず個々の神経細胞の発火だけに着目する。

本研究の結果、単一神経細胞レベルでは分単位で発火頻度が徐々に増加/現象していく例が見られた。このような特性は初めて発見されたものである。例えば、従来発見されている秒単位についての研究で経過時間選択的な発火を示した例では、一過的なバースト発火が見られたものが多い(Pastalkova et al., *Science*, 2008)[9]; (MacDonald et al., *Neuron*, 2011)[10]; (Kraus et al., *Neuron*, 2013)[11]; (MacDonald et al., *J Neurosci*, 2013)[12]; (Salz et al., *J Neurosci*, 2016)[15]。つまり全経過時間にわたって発火が漸次変化していくような、本研究の結果とは差異が見られる。したがって、同じ海馬 CA1 野からの記録ではあるが根本的に新しい発火メカニズムを考える必要があると考えられる。そこで参考になるのがレバープレス課題を採用している研究例である(Emmons et al., *Front Psychol*, 2016)[39]; (Emmons et al., *J Neurosci*, 2017)[40]; (Kim and Narayanan, *Cereb Cortex*, 2018)[41]。これらにおいては線条体や新皮質において徐々に発火頻度が変化していく例が観察された。このメカニズムとして、個々の細胞が外部からの入力を蓄積していく何らかのメカニズムが必要なはずである。しかしこのメカニズムに関しては秒単位についても未だ解明されていない。この仮説は近い将来、電気生理学的に検証されるべきものである。他の例として、(あくまで空間課題の知見ではあるが)神経修飾物質ドパミンの濃度がトライアル中に漸次的に増加するという知見がある(Howe et al., *Nature*, 2013)[50]。このような変化が時間情報処理でも生じているのであれば、神経修飾物質によるベースラインレベルの発火頻度の漸次的変化が、個々の神経細胞の発火頻度の変化を生み出している可能性が考えられるものである。一方で、

単にエサの獲得による報酬応答的な神経発火が見られているわけではないと考えている。報酬応答的な神経発火というのは本来報酬を得た瞬間に数百ミリ秒単位で一過的に見られるものである(Tobler et al., *Science*, 2005)[51]。5分待ち課題でもエサの咀嚼に掛かる時間は10秒程度であった。したがって5分の待ち時間の前半(1分など)で発火頻度のピークを持つ細胞は、報酬応答そのものに応答したというよりも、報酬獲得後に5分を測り始めたことで生じた発火であると考えられる。5分待ち課題(新奇)でも待ち時間の前半にピークを持つような神経発火を示した細胞は見られなかったことから、単純に報酬獲得によって引き起こされた活動ではないことが示唆される。

本研究ではまた、個々の神経細胞が発火頻度のピークをとる値が異なっており、まとめると5分にわたって広く分布していた。このような順番のあるネットワークレベルの発火は発火列と呼ばれており、他の多くの研究で見られている(Pastalkova et al., *Science*, 2008)[9]; (Mello et al., *Curr Biol*, 2015)[33]; (Aronov et al., *Nature*, 2017)[52]; (Terada et al., *Neuron*, 2017)[53]。しかし、先行研究のそれはいずれも秒単位で発生するものであり、本研究のように分単位で続くものは報告されていないため、この結果についても初めての報告となる。これらの神経細胞同士の関係については、発火列がそのままカスケードのように直接的な関係性を持っているとは考えにくい。なぜなら本研究において海馬記録はすべてCA1野から行ったからである。CA1野内だけで発火列、しかも5分にもわたるものが作られるというように考えてはいない。可能性として考えられるのは、CA1に投射するCA3野や嗅内皮質からの入力に関わるも

のである。海馬と嗅内皮質は情報を相互に送り合っており、嗅内皮質でも空間や時間をエンコードする神経発火が見られている (Kraus et al., *Neuron*, 2015)[13]; (Hardcastle et al., *Neuron*, 2017)[54]; (Heys and Dombeck, *Nat Neurosci*, 2018)[55]。このような複数の脳領域で情報をやり取りすることで生じた発火が、結果的に発火列として見られていると考えられる。しかし、それを前提としたうえでもなお、分単位にわたってこれが起こるメカニズムは未解明である。他に考えられるメカニズムとして、例えば5分待ち課題の待ち時間中に①徐々に発火頻度が増加する細胞と②徐々に減少する細胞の間では、インターニューロンを介して抑制的な連絡がある可能性も考えられる。しかしこれらを明らかにするにはパッチクランプなどを用いたより詳細な解析が必要となるため本研究では実施しなかったが、局所回路の特定のためには解明すべき点であると考えられる。

経験に伴う経過時間のエンコードについて：5分待ち課題（新奇）において、終盤のトライアルで時間経過に相関して発火する神経細胞が多く見られた。対して最初期ではそのような細胞がほとんど見られなかった。つまり5分待ち課題を複数トライアル経験することによって経過時間がエンコードされるようになることが示唆された。実際秒単位の知見においても経験によって経過時間をエンコードする神経発火が見られる様子が観察されている (Gill et al., *Hippocampus*, 2011)[17]。同じ0分～5分という分単位の時間幅を複数回経験させただけで、このように毎回類似した発火頻度変化を示すようになっていくメカニズムは初の報告となる。従来報告されているネットワークレベルの経時

的な活動性変化とシナプスレベルの可塑性が組み合わさることで、時間のエンコードが生じ得る可能性が考えられる。

課題条件の変更に対する神経発火の応答について：5分から8分へと待ち時間を変更した場合、経過時間に相関した発火頻度変化を示す細胞は、個々に異なった応答を示した。8分に向けてスケールリングが変化した細胞や、5分を境に発火頻度変化が増加から減少へと転じた細胞もあった。このような結果は、秒単位の知見とも整合性が取れている(MacDonald et al., *Neuron*, 2011)[10]; (Xu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014)[32]; (Mello et al., *Curr Biol*, 2015)[33]。これらを踏まえると、動物は5分の長さの記憶そのものを足掛かりとしつつ、新たな時間長へ適応していくために神経ネットワークが可塑的に変化している可能性が示唆される。もし時間経過に相関した神経発火が、何らかの生化学反応やエサの代謝に関わる因子そのもののダイナミズムをそのまま反映したものであるならば、待ち時間の変更に対してこのような活動変化を起こして対応することは困難であると考えられる。その場合は、徐々に発火頻度が増加する細胞は5分以降もそのまま発火頻度が増加し続けたり、そうでない細胞においてもスケールリングの変化を生じ得なかったりといった観察結果になると考えられる。したがって、経験を通して学習・記憶された時間長に合わせて神経ネットワークが変遷し、その結果として5分や8分にわたる変化が観察されたのだと考えられる。

【結論】

本研究では、海馬の神経発火は分単位の長さをもつ時間経過をエンコードしていることを明らかにした。このような、分単位で繰り返し変化していく海馬の活動パターンは初めての報告である。この神経発火は、個体にとっての内的な時間経過の指標としてとらえることも可能である。本研究ではあくまで物理的な経過時間を神経発火と対応づけることで解析を進めてきたが、将来的に本知見を足掛かりとして個体を流れる時間の流れそのものに着目した研究を行うことも可能になり、時間の相対性などに関する新たな研究へと発展させていくことを計画している。

【図表】



Figure 1. 「5分待ち課題」(A) 課題部屋の上から見た際のイラストを左に、実際の写真を右に示す。訓練を十分に行ったラットでは、エサ場確認行動が見られた (写真)。(B) 1回の課題のタイムスケジュール。1 トライアルは3秒間のエサ提示時間と5分間の待ち時間から構成された。

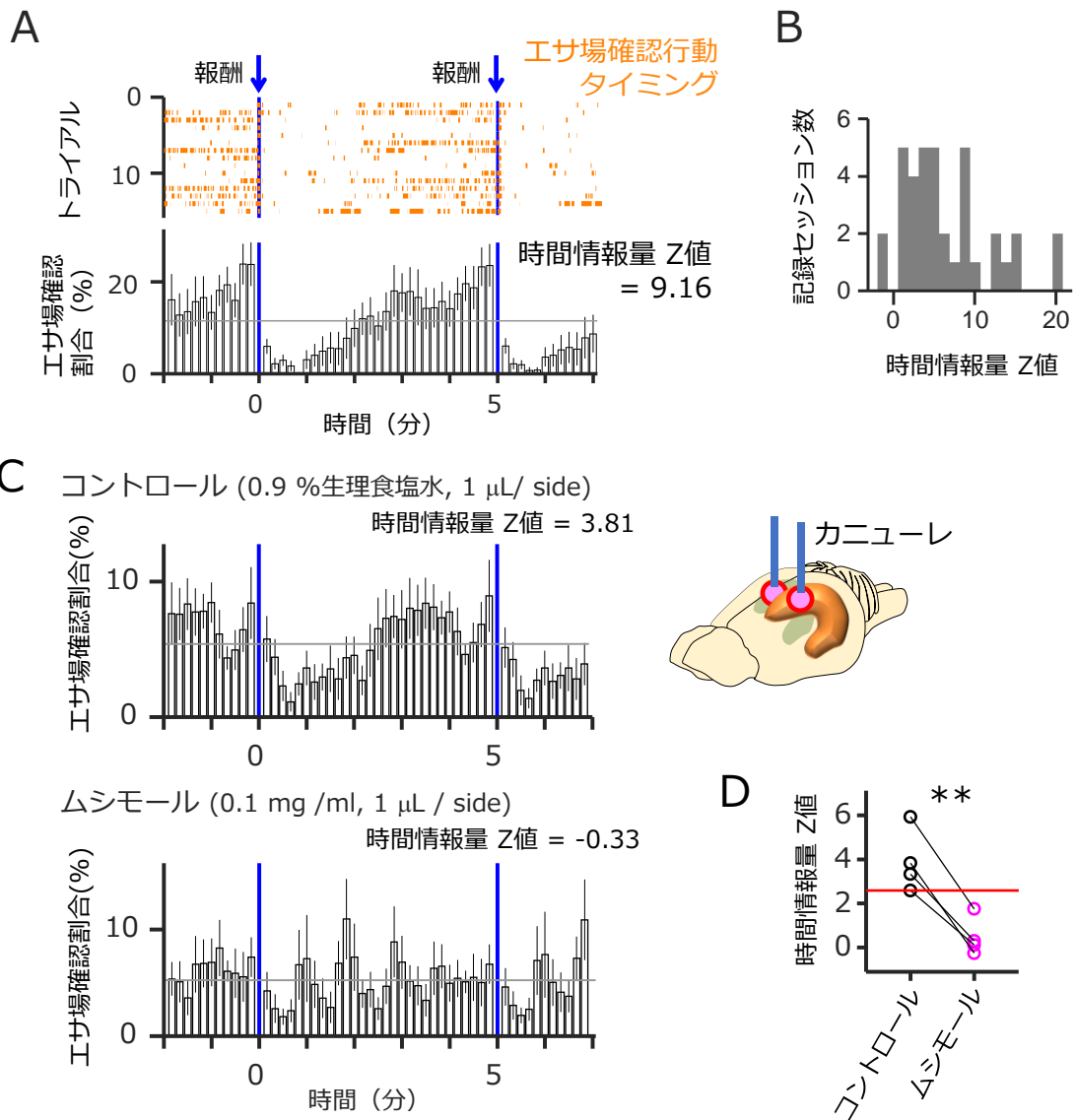


Figure 2. エサ場確認行動の解析。 (A) 1 回の課題中に記録されたエサ場確認行動。上のラスタープロットでオレンジの点がエサ場確認行動をとっていた個々のタイミングを示す。下のヒストグラムではそれぞれの時間ビン (20 秒) における平均値 \pm 標準誤差を示す。灰色横線：全平均値。(B) 時間情報量 Z 値の分布 (37 sessions from 10 rats)。(C) ムシモール投与の影響解析。同一個体から記録された結果例を示す。(D) ムシモール投与による時間情報量 Z 値の変化をコントロールと比較した (4 sessions from 2 rats)。

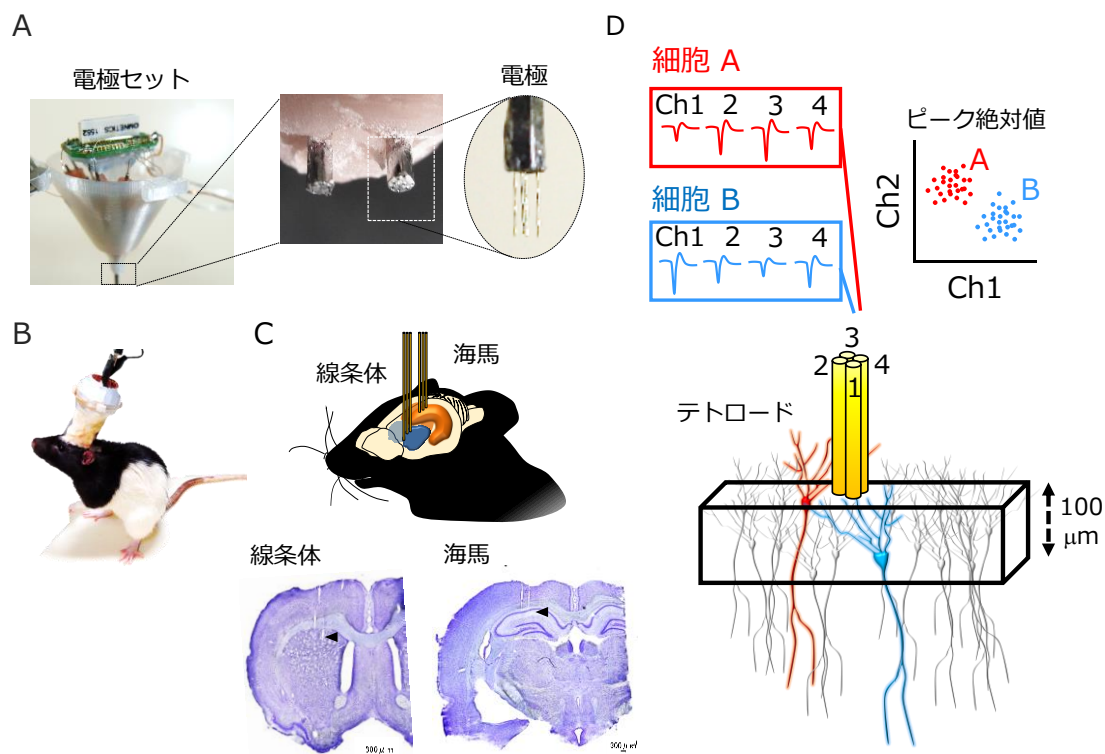


Figure 3. 自由行動下のラット海馬と線条体からの慢性的な神経発火記録手法の概要。(A) 左が電極セット、中央は電極セット先端のバンドル部分の拡大図、右がバンドルに装填された電極の拡大図。海馬と線条体それぞれに電極を刺入するため、バンドルを2つ持つ電極セットを作製した。バンドル間距離 4.3 mm。

(B) 電極セットを埋め込んだラットの写真。(C) 上が電極刺入状況の概念図、左下が線条体の脳切片、右下が海馬の脳切片。鏝で電極先端（神経発火記録位置）の位置を示す。(D) テトロードで多数の神経細胞の発火を記録する原理。1つの電極の記録サイトはチャンネル1-4の4つあり（下）、個々の記録細胞の神経発火は各記録サイトへ異なったスパイク入力比で検出される（左上）。2次元にそれぞれのチャンネルへのピークの大きさの絶対値をプロットすると（右上、1点が1発火に対応）、細胞ごとに発火がクラスターを形成しているように観察される。

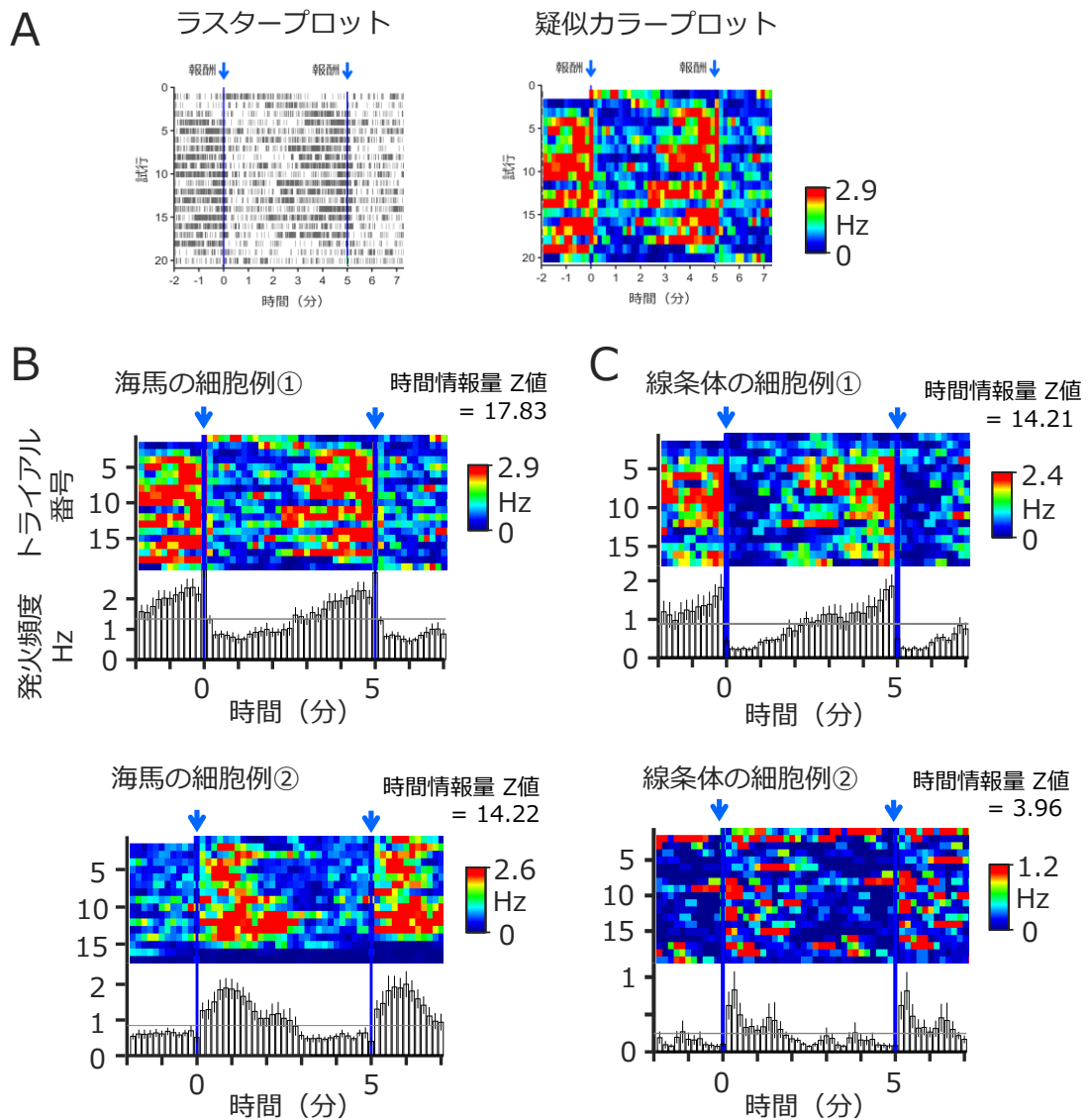


Figure 4. 経過時間に 관련된神經発火の例。(A) 左のラスタプロットは、横軸が5分に及び発火数が多く点がつぶれた。そこで右の疑似カラープロットを用い、発火頻度を色で示した。(B) 単一細胞の神經発火のうち、時間経過に 관련된神經発火を示した例(海馬の2例)。各細胞について、上は疑似カラープロットで、下のヒストグラムは各時間ビン(20秒)の発火頻度の平均±標準誤差を示す。(C) 線条体の神經発火の例。表示方法は(B)と同様。

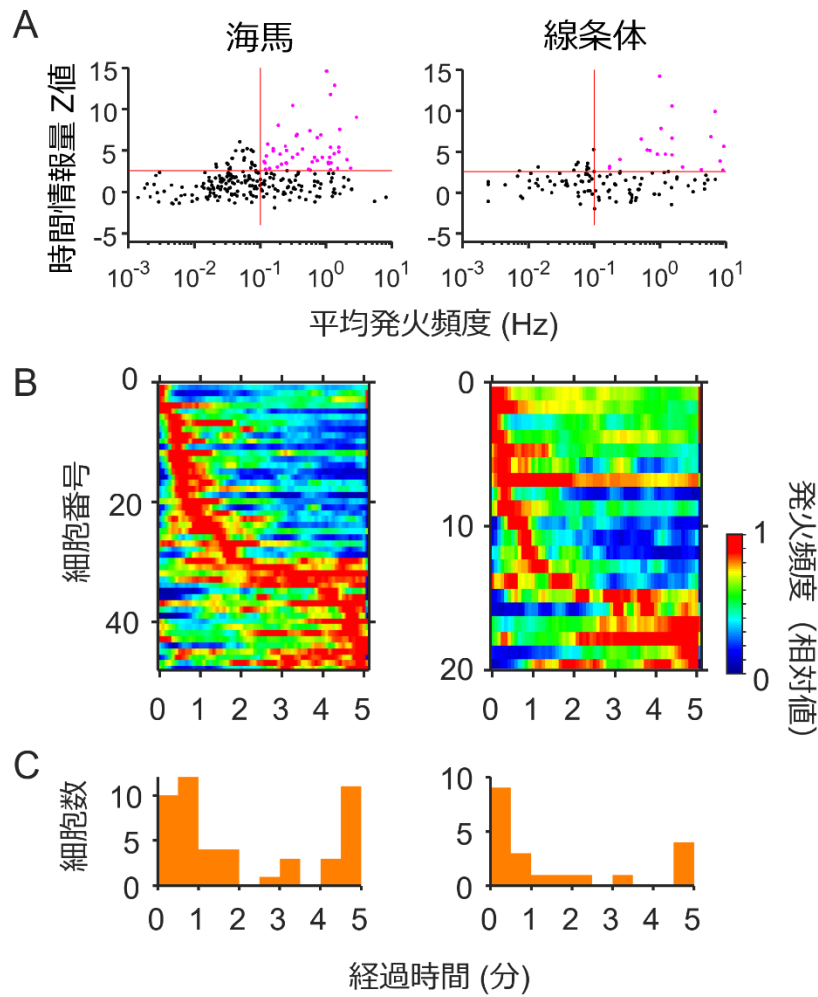


Figure 5. 全記録細胞の解析。 左列が海馬、右列が線条体の結果を示す。(A) 平均発火頻度と時間情報量 Z 値のプロット。マゼンタで表示されている細胞は、有意に高い時間情報量を持ち、時間経過をエンコードしていると定義した細胞。(B) 上記 (A) のマゼンタに該当する細胞の平均発火頻度の変化をまとめたもの。5 分にわたる発火列が見られた。(C) 上記 (A) のマゼンタに該当する細胞が発火頻度のピークをとった時間をヒストグラムで示した。横軸は (B) と対応している。

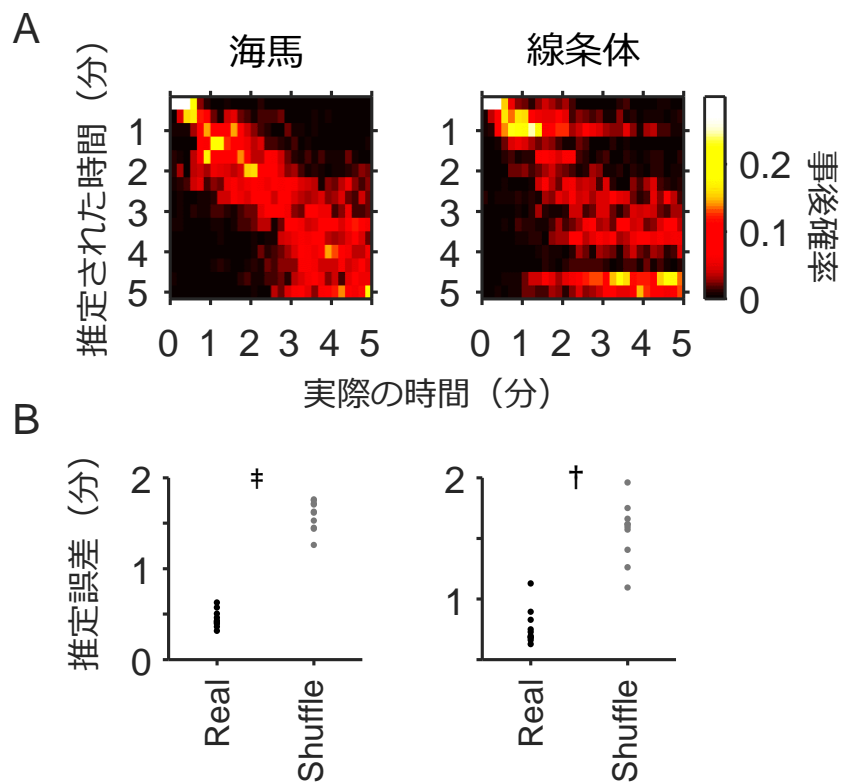


Figure 6. ベイズ推定による神経活動のデコード。左列が海馬で、右列が線条体の結果。(A) 記録時の実際の時間を横軸、その際の神経活動から推定された時間を縦軸にとり、その対応をみた。色で推定の事後確率を表す。(B) 推定誤差（実際の時間と推定された時間の差が何分であるか）をシャッフルデータと比較した（ $\# p = 2.4 \times 10^{-13}$, $\dagger p = 8.2 \times 10^{-8}$ ）。

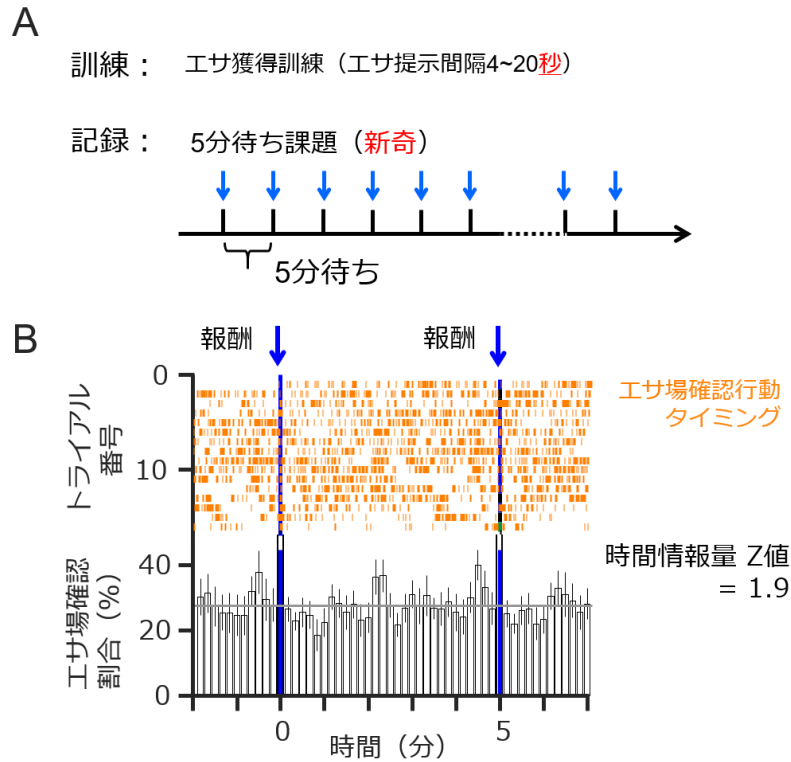


Figure 7. 「5分待ち課題（新奇）」の概要と行動観察結果。(A) 本条件の概要。訓練の際には5分待ち課題を行わず、エサ場からエサを獲得することだけを学ばせ、記録日に初めて5分待ち課題を行わせた。(B) エサ場確認行動の結果例。十分に訓練された個体の結果は Fig. 2 A を参照。表示方法は同様である。

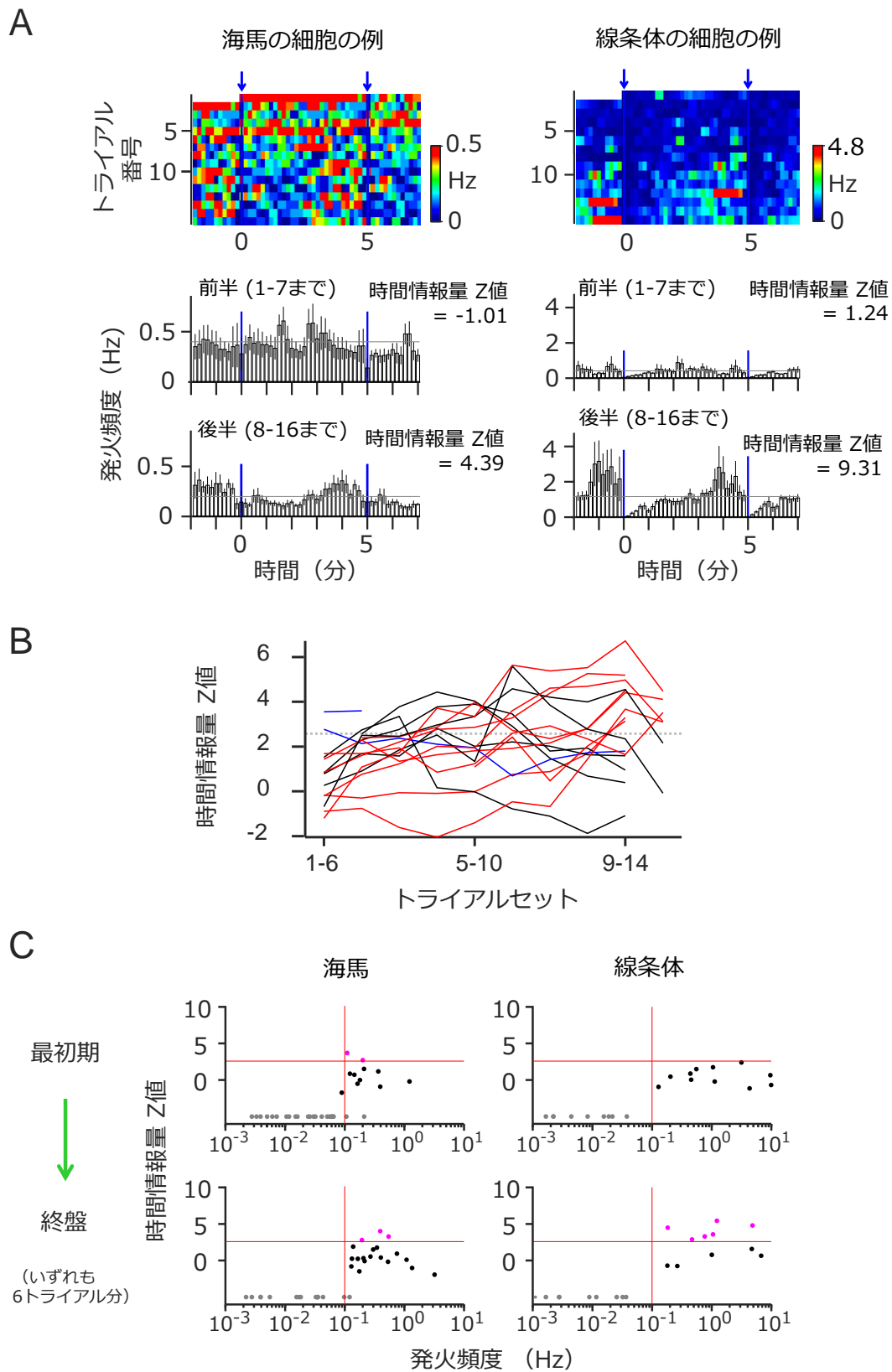


Figure 8. 「5分待ち課題 (新奇)」中に記録された神経発火。(A) 単一細胞の

神経発火で経過時間に相関した発火が見られた例を 2 例示す。各細胞について上のヒストグラムでは課題全体における前半（トライアル番号 1~7）の結果を、下のヒストグラムは課題全体における後半（トライアル番号 7 以降）の結果を示し、それぞれについて時間情報量を計算した。(B) 時間情報量 Z 値の推移。青：課題全体における最初期に時間情報量 Z 値が高かった細胞。赤：課題全体における終盤に時間情報量 Z 値が高かった細胞。黒：それ以外の時間に時間情報量 Z 値が高かった細胞。隣接した 6 トライアルの結果をトライアルセットとみて解析に用いた。発火数が 0.1 Hz 未満であったトライアルを 4 つ以上含むトライアルセットでは時間情報量を定義しなかった（プロットが切れている細胞が該当する)。(C) 課題全体における最初期と終盤の発火頻度と時間情報量 Z 値の変化を全細胞について比較したもの。上の 2 グラフが課題全体における最初期の結果を海馬と線条体についてそれぞれ示したもの。下の 2 グラフは同様に終盤の結果を示したもの。時間情報量が定義されなかった細胞は灰色でプロットした。

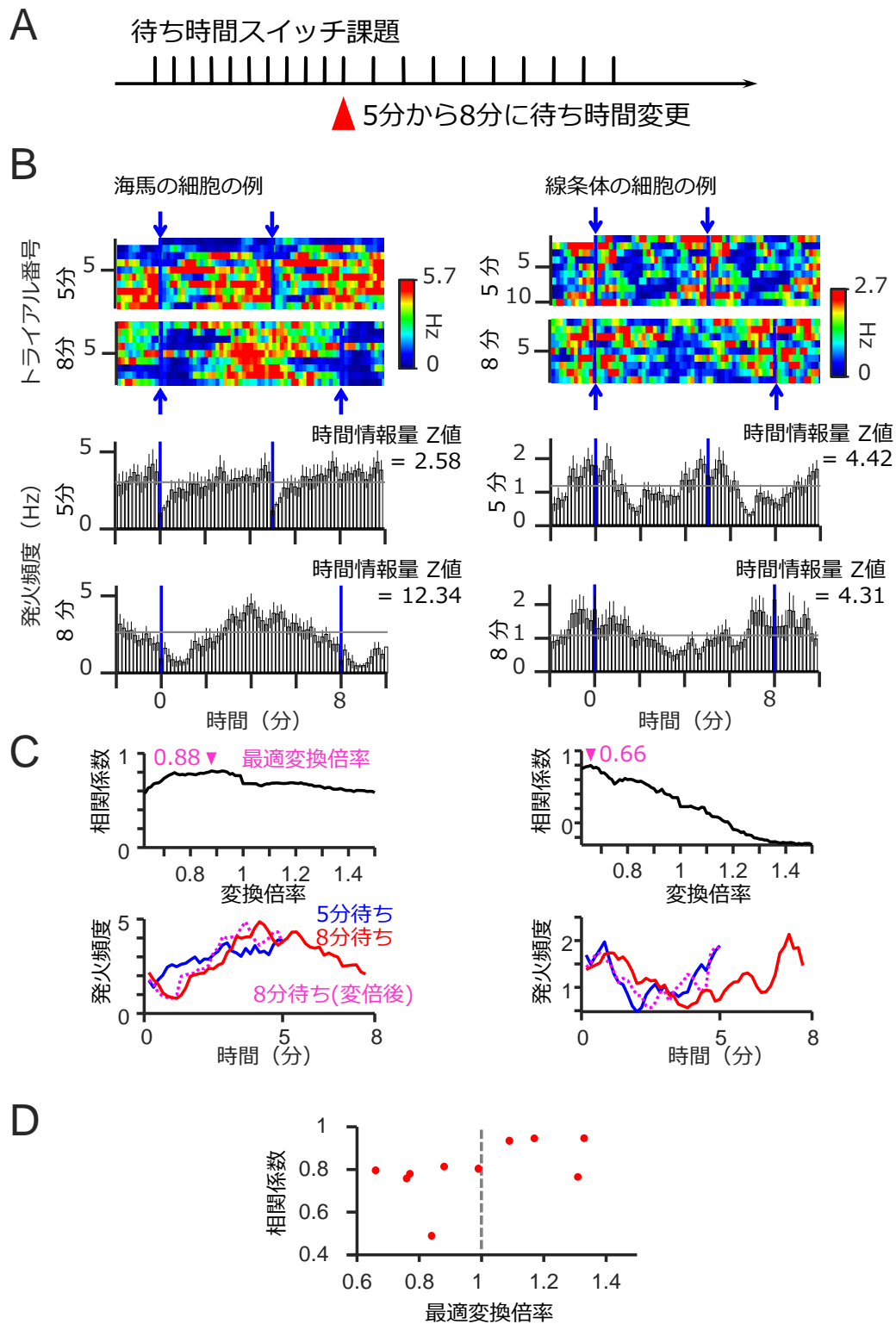


Figure 9. 「待ち時間スイッチ課題」の概要と神経発火。(A) 課題の概要。赤

い鏝で待ち時間の変更が生じたタイミングを示す。(B) 特徴的な神経発火を示した 2 細胞の結果を示す。それぞれの細胞について、上に疑似カラープロット、下にヒストグラムを示す。それぞれを 5 分と 8 分の条件に分けて表示した (実際には一続きの課題である)。(C) 5 分待ちの条件で得られた発火頻度曲線に対する、8 分待ちの結果の最適変換倍率の計算。(B) の 2 細胞に関してそれぞれ調べたもの。上のグラフでは様々な変換倍率を 8 分待ちの結果の時間情報に掛けて変倍し、それを 5 分待ちの結果と比較した際の相関係数の推移を示す。マゼンタの鏝は最大の相関係数をとる倍率、すなわち最適変換倍率を示す。下では 5 分待ち・8 分待ち・そして変倍後の 8 分待ちの発火頻度曲線を比較したものの。(D) 記録細胞の最適変換倍率と相関係数のプロット。ここでは 5 分待ち・8 分待ちの両条件で有意な時間情報量を保持した 10 細胞についての結果を示した (全 89 細胞中)。

【参考文献】

- [1] Clayton, N. S. and A. Dickinson (1998). "Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays." Nature **395**(6699): 272-274.
- [2] Tulving, E. and H. J. Markowitsch (1998). "Episodic and declarative memory: role of the hippocampus." Hippocampus **8**(3): 198-204.
- [3] Tulving, E. (2002). "Episodic memory: from mind to brain." Annu Rev Psychol **53**: 1-25.
- [4] Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- [5] O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." Brain Res **34**(1): 171-175.
- [6] O'Keefe, J. and A. Speakman (1987). "Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task." Exp Brain Res **68**(1): 1-27.
- [7] Shikano, Y., T. Sasaki and Y. Ikegaya (2017). "[Representation of Time by Hippocampal Neurons]." Brain Nerve **69**(11): 1233-1239.
- [8] Buhusi, C. V. and W. H. Meck (2005). "What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing." Nat Rev Neurosci **6**(10): 755-765.
- [9] Pastalkova, E., V. Itskov, A. Amarasingham and G. Buzsaki (2008). "Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus." Science **321**(5894): 1322-1327.
- [10] MacDonald, C. J., K. Q. Lepage, U. T. Eden and H. Eichenbaum (2011). "Hippocampal "time cells" bridge the gap in memory for discontinuous events." Neuron **71**(4): 737-749.
- [11] Kraus, B. J., R. J. Robinson, 2nd, J. A. White, H. Eichenbaum and M. E. Hasselmo (2013). "Hippocampal "time cells": time versus path integration." Neuron **78**(6): 1090-1101.

- [12] MacDonald, C. J., S. Carrow, R. Place and H. Eichenbaum (2013). "Distinct hippocampal time cell sequences represent odor memories in immobilized rats." J Neurosci **33**(36): 14607-14616.
- [13] Kraus, B. J., M. P. Brandon, R. J. Robinson, 2nd, M. A. Connerney, M. E. Hasselmo and H. Eichenbaum (2015). "During Running in Place, Grid Cells Integrate Elapsed Time and Distance Run." Neuron **88**(3): 578-589.
- [14] Nakazono, T., T. Sano, S. Takahashi and Y. Sakurai (2015). "Theta oscillation and neuronal activity in rat hippocampus are involved in temporal discrimination of time in seconds." Front Syst Neurosci **9**: 95.
- [15] Salz, D. M., Z. Tiganj, S. Khasnabish, A. Kohley, D. Sheehan, M. W. Howard and H. Eichenbaum (2016). "Time Cells in Hippocampal Area CA3." J Neurosci **36**(28): 7476-7484.
- [16] Mau, W., D. W. Sullivan, N. R. Kinsky, M. E. Hasselmo, M. W. Howard and H. Eichenbaum (2018). "The Same Hippocampal CA1 Population Simultaneously Codes Temporal Information over Multiple Timescales." Curr Biol **28**(10): 1499-1508 e1494.
- [17] Gill, P. R., S. J. Mizumori and D. M. Smith (2011). "Hippocampal episode fields develop with learning." Hippocampus **21**(11): 1240-1249.
- [18] Roberts, W. A., M. C. Feeney, K. Macpherson, M. Petter, N. McMillan and E. Musolino (2008). "Episodic-like memory in rats: is it based on when or how long ago?" Science **320**(5872): 113-115.
- [19] Jacobs, N. S., T. A. Allen, N. Nguyen and N. J. Fortin (2013). "Critical role of the hippocampus in memory for elapsed time." J Neurosci **33**(34): 13888-13893.
- [20] Manns, J. R., M. W. Howard and H. Eichenbaum (2007). "Gradual changes in hippocampal activity support remembering the order of events." Neuron **56**(3): 530-

540.

- [21] Mankin, E. A., F. T. Sparks, B. Slayyeh, R. J. Sutherland, S. Leutgeb and J. K. Leutgeb (2012). "Neuronal code for extended time in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(47): 19462-19467.
- [22] Ziv, Y., L. D. Burns, E. D. Cocker, E. O. Hamel, K. K. Ghosh, L. J. Kitch, A. El Gamal and M. J. Schnitzer (2013). "Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes." Nat Neurosci **16**(3): 264-266.
- [23] Mankin, E. A., G. W. Diehl, F. T. Sparks, S. Leutgeb and J. K. Leutgeb (2015). "Hippocampal CA2 activity patterns change over time to a larger extent than between spatial contexts." Neuron **85**(1): 190-201.
- [24] Rubin, A., N. Geva, L. Sheintuch and Y. Ziv (2015). "Hippocampal ensemble dynamics timestamp events in long-term memory." Elife **4**.
- [25] Tsao, A., J. Sugar, L. Lu, C. Wang, J. J. Knierim, M. B. Moser and E. I. Moser (2018). "Integrating time from experience in the lateral entorhinal cortex." Nature **561**(7721): 57-62.
- [26] Block, R. A., E. J. George and M. A. Reed (1980). "A watched pot sometimes boils: a study of duration experience." Acta Psychol (Amst) **46**(2): 81-94.
- [27] Brown, S. W. (1985). "Time perception and attention: the effects of prospective versus retrospective paradigms and task demands on perceived duration." Percept Psychophys **38**(2): 115-124.
- [28] Boltz, M. G., C. Kupperman and J. Dunne (1998). "The role of learning in remembered duration." Mem Cognit **26**(5): 903-921.
- [29] Dutke, S. (2005). "Remembered duration: working memory and the reproduction of intervals." Percept Psychophys **67**(8): 1404-1413.
- [30] Matell, M. S. and W. H. Meck (1999). "Reinforcement-induced within-trial resetting

- of an internal clock." Behav Processes **45**(1-3): 159-171.
- [31] Matell, M. S., W. H. Meck and M. A. Nicolelis (2003). "Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons." Behav Neurosci **117**(4): 760-773.
- [32] Xu, M., S. Y. Zhang, Y. Dan and M. M. Poo (2014). "Representation of interval timing by temporally scalable firing patterns in rat prefrontal cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(1): 480-485.
- [33] Mello, G. B., S. Soares and J. J. Paton (2015). "A scalable population code for time in the striatum." Curr Biol **25**(9): 1113-1122.
- [34] Shikano, Y., T. Sasaki and Y. Ikegaya (2018). "Simultaneous Recordings of Cortical Local Field Potentials, Electrocardiogram, Electromyogram, and Breathing Rhythm from a Freely Moving Rat." J Vis Exp(134).
- [35] Shikano, Y., Y. Ikegaya and T. Sasaki (2018). "Monitoring brain neuronal activity with manipulation of cardiac events in a freely moving rat." Neurosci Res **136**: 56-62.
- [36] Shikano, Y., Y. Nishimura, T. Okonogi, Y. Ikegaya and T. Sasaki (2018). "Vagus nerve spiking activity associated with locomotion and cortical arousal states in a freely moving rat." Eur J Neurosci.
- [37] Yin, B. and W. H. Meck (2014). "Comparison of interval timing behaviour in mice following dorsal or ventral hippocampal lesions with mice having delta-opioid receptor gene deletion." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1637): 20120466.
- [38] Delamater, A. R. and D. M. Nicolas (2015). "Temporal Averaging Across Stimuli Signaling the Same or Different Reinforcing Outcomes in the Peak Procedure." Int J Comp Psychol **28**.
- [39] Emmons, E. B., R. N. Ruggiero, R. M. Kelley, K. L. Parker and N. S. Narayanan (2016). "Corticostriatal Field Potentials Are Modulated at Delta and Theta Frequencies

- during Interval-Timing Task in Rodents." Front Psychol **7**: 459.
- [40] Emmons, E. B., B. J. De Corte, Y. Kim, K. L. Parker, M. S. Matell and N. S. Narayanan (2017). "Rodent Medial Frontal Control of Temporal Processing in the Dorsomedial Striatum." J Neurosci **37**(36): 8718-8733.
- [41] Kim, Y. C. and N. S. Narayanan (2018). "Prefrontal D1 Dopamine-Receptor Neurons and Delta Resonance in Interval Timing." Cereb Cortex.
- [42] Kim, J., A. H. Jung, J. Byun, S. Jo and M. W. Jung (2009). "Inactivation of medial prefrontal cortex impairs time interval discrimination in rats." Front Behav Neurosci **3**: 38.
- [43] Kim, J., J. W. Ghim, J. H. Lee and M. W. Jung (2013). "Neural correlates of interval timing in rodent prefrontal cortex." J Neurosci **33**(34): 13834-13847.
- [44] Gouvea, T. S., T. Monteiro, A. Motiwala, S. Soares, C. Machens and J. J. Paton (2015). "Striatal dynamics explain duration judgments." Elife **4**.
- [45] Soares, S., B. V. Atallah and J. J. Paton (2016). "Midbrain dopamine neurons control judgment of time." Science **354**(6317): 1273-1277.
- [46] Quinn, J. J., S. S. Oommen, G. E. Morrison and M. S. Fanselow (2002). "Post-training excitotoxic lesions of the dorsal hippocampus attenuate forward trace, backward trace, and delay fear conditioning in a temporally specific manner." Hippocampus **12**(4): 495-504.
- [47] McEchron, M. D., W. Tseng and J. F. Disterhoft (2003). "Single neurons in CA1 hippocampus encode trace interval duration during trace heart rate (fear) conditioning in rabbit." J Neurosci **23**(4): 1535-1547.
- [48] Meck, W. H., R. M. Church, G. L. Wenk and D. S. Olton (1987). "Nucleus basalis magnocellularis and medial septal area lesions differentially impair temporal memory." J Neurosci **7**(11): 3505-3511.

- [49] Olton, D. S., W. H. Meck and R. M. Church (1987). "Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory dysfunctions." Brain Res **404**(1-2): 180-188.
- [50] Howe, M. W., P. L. Tierney, S. G. Sandberg, P. E. Phillips and A. M. Graybiel (2013). "Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards." Nature **500**(7464): 575-579.
- [51] Tobler, P. N., C. D. Fiorillo and W. Schultz (2005). "Adaptive coding of reward value by dopamine neurons." Science **307**(5715): 1642-1645.
- [52] Aronov, D., R. Nevers and D. W. Tank (2017). "Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal-entorhinal circuit." Nature **543**(7647): 719-722.
- [53] Terada, S., Y. Sakurai, H. Nakahara and S. Fujisawa (2017). "Temporal and Rate Coding for Discrete Event Sequences in the Hippocampus." Neuron **94**(6): 1248-1262 e1244.
- [54] Hardcastle, K., N. Maheswaranathan, S. Ganguli and L. M. Giocomo (2017). "A Multiplexed, Heterogeneous, and Adaptive Code for Navigation in Medial Entorhinal Cortex." Neuron **94**(2): 375-387 e377.
- [55] Heys, J. G. and D. A. Dombeck (2018). "Evidence for a subcircuit in medial entorhinal cortex representing elapsed time during immobility." Nat Neurosci **21**(11): 1574-1582.

【謝辞】

博士課程 3 年間にわたってご指導頂きました池谷裕二教授、小山隆太准教授、佐々木拓哉助教、中嶋藍先生、竹内春樹先生、松本信圭先生に厚く御礼申し上げます。私が博士課程から薬品作用学教室に所属し始めて博士論文をまとめるまでの長い期間、本研究の実験系立ち上げからデータの解析に至るまで数多くのディスカッションをさせて頂きました。ひとつの研究を成し遂げるということがいかに大変なことで、同時にその経験が将来どれほど大切なものになっていくのかということを感じさせられた日々でした。

私が本研究をここまで遂行することが出来た背景には、実はいくつもの幸運がありました。そもそも修士の頃（理学部の研究室）から時間のエンコードに興味を持っており、漠然とした研究構想を持ちながら薬品作用学教室を訪れたことがありました。その際、佐々木先生が留学から帰ってこられて、自由行動下の動物から神経発火を記録する技術を立ち上げていらっしゃるというお話を偶然伺い、ここなら時間のテーマを実現することが出来るはずだと直感しました。さらに研究室所属後、池谷先生が所属されている新学術領域が時間知覚についてのテーマを扱っているということを知り、領域会議で関連分野の研究者の方々と議論をする機会にも恵まれました。また佐々木グループ黎明期から所属する先駆的な学生のみなさんが、神経発火記録技術を当研究室で立ち上げてくれていたおかげで、研究室に所属した直後から私はスムーズに実験作業に入ることが出来ました。ここに改めて、本研究をサポートして下さったすべての皆様に御礼申し上げます。ありがとうございました。 2019/02/22